



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y
Geográfica
Unidad de Posgrado

Determinación de los principios activos de valor real y/o potencial de la especie nativa tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia); bosque de Jacarón, Juan de Velasco, Chimborazo, Ecuador

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias
Ambientales

AUTOR

Silvia Hipatia TORRES RODRÍGUEZ

ASESOR

Dra. María Clarisa TOVAR TORRES DE AGUILAR

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Torres, S. (2019). *Determinación de los principios activos de valor real y/o potencial de la especie nativa tarqui (Hedyosmum luteynii Todzia); bosque de Jacarón, Juan de Velasco, Chimborazo, Ecuador*. Tesis para optar grado de Doctor en Ciencias Ambientales. Unidad de Posgrado, Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS.

CÓDIGO ORCID DEL AUTOR: NO TIENE

CÓDIGO ORCID DEL ASESOR: 0000-0002-3297-4147

DNI: 0602087603

GRUPO DE INVESTIGACIÓN: CLEAN ENERGY Y ENVIRONMENT

INSTITUCIÓN QUE FINANCIA PARCIAL O TOTALMENTE LA INVESTIGACIÓN:

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO. RIOBAMBA-ECUADOR.

UBICACIÓN GEOGRÁFICA DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN. DEBE INCLUIR LOCALIDADES Y COORDENADAS GEOGRÁFICAS:

El bosque natural de Jacarón está ubicado en la Comunidad El Tablón, perteneciente a la parroquia rural Juan de Velasco (Pangor), cantón Colta, provincia de Chimborazo, Ecuador.

Ubicación de la parroquia Juan de Velasco: Sur Occidente del Cantón Colta.

- Límites geográficos:

Norte: Parroquia Cañi y Villa la Unión,

Sur: Cantón Pallatanga,

Este: Parroquia Columbe,

Oeste: Parroquia Cañi y Provincia de Bolívar.

- Altura Bosque de Jacarón: entre 2600 – 3400 msnm.
- Coordenadas Bosque de Jacarón: Zona 17S
UTM: $x = 735000$ $y = 9787500$

AÑO O RANGO DE AÑOS QUE LA INVESTIGACIÓN ABARCÓ:

Febrero 2015-Agosto 2017



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú, Decana de América

FACULTAD DE INGENIERÍA GEOLÓGICA, MINERA, METALÚRGICA Y GEOGRÁFICA

UNIDAD DE POSGRADO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

SUSTENTACIÓN PÚBLICA

En la Universidad Nacional Mayor de San Marcos–Lima, a los trece días del mes de agosto del 2019, siendo las 15:00 horas, se reúnen los suscritos miembros del JURADO EXAMINADOR DE TESIS, nombrado mediante Dictamen N.º 500/UPG-FIGMMG/2019 del 11 de julio del 2019, con la finalidad de evaluar la sustentación oral de la siguiente tesis:

TITULO

«DETERMINACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE VALOR REAL Y/O POTENCIAL DE LA ESPECIE NATIVA TARQUI (*Hedyosmum luteynii* Todzia); BOSQUE DE JACARÓN, JUAN DE VELASCO, CHIMBORAZO, ECUADOR»

Que, presenta la Mag. **SILVIA HIPATIA TORRES RODRÍGUEZ**, para optar el **GRADO ACADÉMICO DE DOCTORA EN CIENCIAS AMBIENTALES**.

El secretario del Jurado Examinador de la Tesis, analiza el expediente N° 06323-FIGMMG-2013 del 23 de agosto del 2013, en el marco legal y Estatutario de la Ley Universitaria, acreditando que tiene todos los documentos y cumplió con las etapas del trámite según el «Reglamento de los Estudios de Maestría y Doctorado».

Luego de la Sustentación de la Tesis, los miembros del Jurado Examinador procedieron a aplicar la escala descrita en el Art. 61 del precitado Reglamento, correspondiéndole al graduando la siguiente calificación:

..... *muy Buena (14)*

Habiendo sido aprobada la sustentación de la Tesis, el Presidente recomienda a la Facultad se le otorgue el **GRADO ACADÉMICO DE DOCTORA EN CIENCIAS AMBIENTALES** a la Mag. **SILVIA HIPATIA TORRES RODRÍGUEZ**.

Siendo las 16:00 horas, se dio por concluido al acto académico


DR. CARLOS FRANCISCO CABRERA CARRANZA
Presidente


DRA. JOAQUINA ADELaida ALBÁN CASTILLO
Secretaria


DR. DIEGO VACILI BURBANO SALAS
Miembro


DRA. MARÍA CLARISA TOVAR TORRES DE AGUILAR
Asesor

DEDICATORIA

A mi madre, a mi hija, quienes son el motor que impulsa mi superación.

Silvia Hipatia Torres Rodríguez

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a Dios, quien me ha permitido a través de la realización del presente Trabajo de Investigación, alcanzar un sueño tan anhelado en mi formación profesional como es obtener el Grado de Doctora en Ciencias Ambientales.

Agradezco a la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en nombre del Dr. Carlos Cabrera, por haberme permitido formarme en ella y mejorar como profesional con conciencia académica, ética y convicción de servicio social.

Un sentido Gracias a mi querida Universidad Nacional de Chimborazo por todo el apoyo brindado para la consecución de este objetivo académico.

Manifiesto mi profundo agradecimiento por los valiosos aportes en la realización de este trabajo a mi tutora Dra. María Tovar Torres y a los miembros de mi tribunal revisor, Dra. Joaquina Albán y Dr. Diego Burbano,

Un sentido agradecimiento a quienes aportaron de una u otra manera para la realización de esta investigación, a la Dra. Cumandá Játiva, Dr. Víctor García, Dra. María Eugenia Lucena, Dr. Kléver Torres, Mgs. Gabriela Serrano, Ing. Segundo Apugllón (miembro de la comunidad aledaña al bosque de Jacarón).

ÍNDICE GENERAL

Contenido

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO.....	IV
ÍNDICE GENERAL.....	V
LISTA DE CUADROS	VIII
LISTA DE FIGURAS	XII
RESUMEN	XVI
ABSTRACT	XVII
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Situación problemática.....	1
1.2. Formulación del problema	3
1.2.1. Problema general	3
1.2.2. Problemas específicos.....	3
1.3. Justificación teórica	4
1.4. Justificación práctica.....	6
1.5. Objetivos.....	7
1.5.1. Objetivo general.....	7
1.5.2. Objetivos específicos	8
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	9
2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación.....	9
2.2. Antecedentes de investigación	12
2.2.1. Investigación de productos naturales de plantas de Ecuador con posible actividad biológica en seres vivos.....	13
2.2.2. Bioactividades de interés	16
2.2.3. Perspectivas actuales y objetivos	20
2.2.4. El conocimiento tradicional documentado.....	23
2.2.5. Determinaciones cuantitativas	24
2.2.6. Evaluación fitoquímica, farmacológica y toxicológica	25
2.2.7. Propuestas de compensación a la comunidad	25
2.3. Bases teóricas	26
2.3.1. Distribución de la especie Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia) en la región andina	26

2.3.2. Inventario forestal del bosque de Jacarón, Columbe, Chimborazo, Ecuador	29
2.3.3. Características morfológicas de la especie <i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia	30
2.3.4. Metabolismo secundario de las plantas	32
2.3.5. Función ecológica y fisiológica de los metabolitos secundarios	34
2.3.6. Principales metabolitos secundarios.....	34
2.3.7. Principios activos de las plantas	35
2.3.8. Familia Chloranthaceae.	36
2.3.9. Evaluación biofísica del bosque de Jacarón	37
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA.....	40
3.1. Área de estudio.....	40
3.2. Materiales y métodos para el muestreo y recolección del material vegetal de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	42
3.2.1. Materiales para la recolección del material vegetal de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	42
3.2.2. Métodos para la selección del material vegetal de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	43
3.3. Materiales y métodos para el análisis fitoquímico de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia)	48
3.3.1. Materiales para para el análisis fitoquímico de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	48
3.3.2. Reactivos para el análisis fitoquímico del Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	50
3.3.3. Equipos para el análisis fitoquímico de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	50
3.3.4. Métodos para el análisis fitoquímico de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	52
3.4. Materiales y métodos para el estudio del aceite esencial de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia)	71
3.4.1. Materiales para el estudio del aceite del aceite esencial de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia)	71
3.4.2. Equipos para el estudio del aceite esencial de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	72
3.4.3. Métodos para el estudio del aceite esencial de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	73
3.4.4. Determinación estructural de los compuestos químicos del aceite esencial del Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	76
3.5. Materiales y métodos para la determinación de la actividad microbiológica de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	77
3.5.1. Materiales para la determinación de la actividad microbiológica del Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia)	77
3.5.2. Equipos para la determinación de la actividad microbiológica del Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia)	78

3.5.3. Métodos para la determinación de la actividad microbiológica de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia)	79
3.6. Pruebas in vivo, del extracto acuoso de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia)	86
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	97
4.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados.....	97
4.1.1. Análisis fitoquímico para determinar los principios activos de la especie forestal nativa Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia)	97
4.1.2. Caracterización cualitativa fitoquímica de la especie forestal nativa Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia)	102
4.1.3. Análisis fitoquímico del extracto etanólico de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	106
4.1.4. Determinación de la estructura química de los aceites esenciales de las hojas de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	124
4.1.5. Determinación de la actividad microbiológica de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	129
4.1.6. Pruebas in vivo	137
4.2. Pruebas de hipótesis	144
4.2.1. Hipótesis para el cumplimiento del objetivo 1	144
4.2.2. Hipótesis para el cumplimiento del objetivo 2	161
4.2.3. Hipótesis para el cumplimiento del objetivo 3	173
CONCLUSIONES.....	185
RECOMENDACIONES	190
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	192
ANEXOS	204
ANEXO 1: Inventario forestal y recolección del material vegetal.....	204
ANEXO 2: Preparación de muestras en laboratorio	205
ANEXO 3. Extracción del aceite.....	206
ANEXO 4. Identificación y descripción del Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia)	207

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Composición de aceites esenciales de especies del género <i>Hedyosmum</i> en términos de monoterpenos hidrocarburos (MH), monoterpenos oxigenados (MO), sesquiterpenos hidrocarburos (SH) y sesquiterpenos oxigenados (SO)	17
Cuadro 2: Distribución de la especie <i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia.....	26
Cuadro 3: Abundancia de especies vegetales en el Bosque de “Jacarón”	29
Cuadro 4: Valor de importancia de la especie <i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia, en el Bosque de “Jacarón”	30
Cuadro 5: Características morfológicas <i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia.....	31
Cuadro 6: Matriz de evaluación del medio abiótico del bosque Jacarón	38
Cuadro 7: Matriz de evaluación del medio biótico del bosque Jacarón.....	39
Cuadro 8: Materiales utilizados para la recolección del material vegetal de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	42
Cuadro 9: Ficha de recolección de muestra vegetal de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	44
Cuadro 10: Materiales utilizados para el análisis fitoquímico del Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	48
Cuadro 11: Reactivos utilizados para el análisis fitoquímico del Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	50
Cuadro 12: Equipos utilizados para el análisis fitoquímico del Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	50
Cuadro 13: Reacciones de caracterización para grupos fitoquímicos	59
Cuadro 14: Materiales para el estudio del aceite esencial del Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	71

Cuadro 15: Equipos utilizados para la determinación estructural de los metabolitos secundarios del aceite esencial de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	72
Cuadro 16: Materiales para establecer la actividad microbiológica de los aceites esenciales de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	77
Cuadro 17: Equipos utilizados para estudios de actividad microbiológica de la porción etérea de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia)	78
Cuadro 18: Variables de diseño para el experimento.....	87
Cuadro 19: Resultados del análisis proximal de las de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	98
Cuadro 20: Análisis cualitativo de la caracterización fitoquímica del extracto etéreo, de las hojas de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	103
Cuadro 21: Caracterización cualitativa fitoquímica del extracto alcohólico de las hojas de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia)	104
Cuadro 22: Caracterización cualitativa fitoquímica del extracto acuoso de las hojas de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia)	105
Cuadro 23: Evaluación organoléptica y físico-química del extracto etanólico de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia)	108
Cuadro 24: Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia) para la identificación de grupos funcionales.....	110
Cuadro 25: Identificación de los compuestos del aceite esencial de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia) por CG-EM	126
Cuadro 26: Actividad antimicrobiana de los extractos y sus fracciones de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia), frente a distintos microorganismos.....	132
Cuadro 27: Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	136

Cuadro 28: Valores de los bio-indicadores de la química sanguínea el día 0 y una vez transcurrido 15 días con diferentes dosis del extracto acuoso de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia)	138
Cuadro 29: Valores de los bio- indicadores biológicos de células sanguíneas el día 0 y una vez transcurrido 15 días con diferentes dosis del extracto acuoso de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia)	140
Cuadro 30: Valores medios y error estándar de bio-indicadores de química sanguínea de ratones modelo.....	141
Cuadro 31: Valores medios y error estándar de bio-indicadores biológicos de células sanguíneas	143
Cuadro 32: Valores medios y error estándar de bio-indicadores biológicos de células sanguíneas	143
Cuadro 33: Análisis de Varianza para porcentaje de grasa	150
Cuadro 34: Análisis de Varianza para porcentaje de proteína.....	157
Cuadro 35: Nombres de las muestras usadas para pruebas ANOVA de una vía	163
Cuadro 36: Datos del grado de inhibición para <i>Staphylococcus aureus</i>	163
Cuadro 37: Anova de una vía para el grado de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i>	164
Cuadro 38: Subconjuntos homogéneos para el grado de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i>	164
Cuadro 39: Datos del grado de inhibición para <i>Klebsiella pneumoniae</i>	166
Cuadro 40: Datos del grado de inhibición para <i>Escherichia coli</i>	167
Cuadro 41: Anova de una vía para el grado de inhibición de <i>Escherichia coli</i>	168
Cuadro 42: Subconjuntos homogéneos para el grado de inhibición de <i>Escherichia coli</i>	168
Cuadro 43: Datos del grado de inhibición para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	170

Cuadro 44: Anova de una vía para el grado de inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	170
Cuadro 45: Subconjuntos homogéneos para el grado de inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	171
Cuadro 46: Concentraciones del aceite esencial de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia) para el análisis microbiológico.....	175
Cuadro 47: Datos del grado de inhibición del aceite esencial para <i>Staphylococcus aureus</i>	175
Cuadro 48: Anova de una vía para el grado de inhibición del aceite esencial para <i>Staphylococcus aureus</i>	175
Cuadro 49: Subconjuntos homogéneos para el grado de inhibición del aceite esencial para <i>Staphylococcus aureus</i>	176
Cuadro 50: Datos del grado de inhibición del aceite esencial para <i>Klebsiella pneumoniae</i>	178
Cuadro 51: Anova de una vía para el grado de inhibición del aceite esencial para <i>Klebsiella pneumoniae</i>	178
Cuadro 52: Subconjuntos homogéneos para el grado de inhibición del aceite esencial para <i>Klebsiella pneumoniae</i>	179
Cuadro 53: Datos del grado de inhibición del aceite esencial para <i>Escherichia coli</i>	180
Cuadro 54: Anova de una vía para el grado de inhibición del aceite esencial para <i>Escherichia coli</i>	181
Cuadro 55: Subconjuntos homogéneos para el grado de inhibición del aceite esencial para <i>Escherichia coli</i>	181
Cuadro 56: Datos del grado de inhibición del aceite esencial para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	183
Cuadro 57: Anova de una vía para el grado de inhibición del aceite esencial para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	183

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas para la obtención de compuestos químicos de vegetales para uso biotecnológico..	15
Figura 2: Distribución del género <i>Hedyosmum</i> en el Ecuador.....	28
Figura 3: Los metabolitos secundarios y su función en las plantas..	33
Figura 4: Ubicación del bosque de Jacarón.	41
Figura 5: Diseño metodológico para el procesamiento del material vegetal de Tarqui.	45
Figura 6: Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).	47
Figura 7: Esquema para el análisis fitoquímico de Tarqui.	54
Figura 8: Esquema de obtención de extractos alcohólico, etéreo y acuoso de Tarqui.	56
Figura 9: Esquema del análisis fitoquímico cualitativo en el extracto etéreo de Tarqui.	57
Figura 10: Esquema del análisis fitoquímico cualitativo en el extracto alcohólico de Tarqui.....	58
Figura 11: Esquema del análisis fitoquímico cualitativo en el extracto acuoso de Tarqui.	58
Figura 12: Marcha fitoquímica preliminar.	64
Figura 13: Tratamiento del extracto etanólico de Tarqui.....	65
Figura 14: Pruebas colorimétricas	65
Figura 15: Eliminación de clorofilas	66
Figura 16: Obtención de subextractos	66
Figura 17: Cromatografías en capa fina.....	67
Figura 18: Cromatografías en placa	68

Figura 19: Unificación de fracciones.....	68
Figura 20: Esquema para la obtención de los aceites esenciales de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).....	75
Figura 21: Hojas Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia)	75
Figura 22: Trampa de Clevenger.	75
Figura 23: Obtención del aceite esencial de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).	76
Figura 24: Esquema de evaluación de la actividad microbiológica.....	79
Figura 25: Esquema de ubicación de los microorganismos en el medio de cultivo	82
Figura 26: Boxplot del porcentaje de humedad.	99
Figura 27: Boxplot del porcentaje de cenizas totales.	100
Figura 28: Boxplot del porcentaje de fibra.....	101
Figura 29: CCF. Extracto etanólico de Tarqui.	113
Figura 30: Cromatografía CCF 1.....	115
Figura 31: Cromatografía HPLC 1.	116
Figura 32: Cromatografía CCF 2.....	117
Figura 33: Cromatografía CCF 2.....	118
Figura 34: Cromatografía HPLC 2.	119
Figura 35: Cromatografía CCF 3.	121
Figura 36: Cromatografía en columna: HPLC 4.	122
Figura 37: HPLC 4.....	123
Figura 38: Actividad antibacteriana del aceite esencial de Tarqui (<i>Hedyosmum</i> <i>luteynii</i> Todzia) en <i>Escherichia coli</i> ATCC: 25922.....	134

Figura 39: Actividad antibacteriana del aceite esencial de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia) en <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC: 25922.	135
Figura 40: Actividad antibacteriana del aceite esencial de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia) en <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.	135
Figura 41: Actividad antibacteriana del aceite esencial de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia) en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.	135
Figura 42: Residuales para porcentaje de grasa.	146
Figura 43: Prueba de normalidad para porcentaje de grasa.	147
Figura 44: Prueba de igualdad de varianzas para el porcentaje de grasa.	148
Figura 45: Diagrama Pareto de efectos estandarizados para porcentaje de grasa.	150
Figura 46: Interacción de factores para porcentaje de grasa.	152
Figura 47: Efectos principales para porcentaje de grasa.	152
Figura 48: Residuales para porcentaje de proteína.	154
Figura 49: Prueba de normalidad para porcentaje de proteína.	155
Figura 50: Prueba de igualdad de varianzas para porcentaje de proteína.	156
Figura 51: Diagrama Pareto de efectos estandarizados para porcentaje de proteína.	158
Figura 52: Interacción para porcentaje de proteína.	160
Figura 53: Efectos principales para el porcentaje de proteína.	160
Figura 54: Medias para el grado de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i>	165
Figura 55: Medias para el grado de inhibición de <i>Escherichia coli</i>	169
Figura 56: Medias para el grado de inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	172
Figura 57: Medias para el grado de inhibición del aceite esencial para <i>Staphylococcus aureus</i>	177

Figura 58: Medias para el grado de inhibición del aceite esencial para <i>Klebsiella pneumoniae</i>	179
Figura 59: Medias para el grado de inhibición del aceite esencial para <i>Escherichia coli</i>	182
Figura 60: Medias para el grado de inhibición del aceite esencial para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	184

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar los principios activos de valor real y/o potencial, de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), en el bosque de Jacarón, Juan de Velasco, Chimborazo, Ecuador, por considerarse una especie vegetal con posibles propiedades medicinales cuya infusión de hojas frescas ha sido utilizada ancestralmente para controlar afecciones asociados al tracto digestivo y respiratorio. En el caso del Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) no se han encontrado reportes sobre su actividad etnomédica. Para la realización de esta investigación se seleccionaron hojas desarrolladas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) del bosque de Jacarón. En el tamizaje fitoquímico fueron identificados saponinas, fenoles y terpenos en mayor cantidad y pocos flavonoides. En el análisis del aceite esencial fueron hallados 28 compuestos, los cuales equivalen al 98,62% del total de los constituyentes. La mayor parte de estos compuestos son monoterpenos hidrocarburos naturales (83,21%). En orden de abundancia se encuentran: “ α -felandreno (32,72%), α -pineno (13,20%), (Z)- β -ocimeno (10,99%), silvestreno (6,51%), biciclogermacreno (5,05%), 1,8-cineol (4,95%), (E)- β -ocimeno (3,88%) y germacreno D (3,20%)”. El aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) inhibió el desarrollo de bacterias Gram positivo (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) y Gram negativo (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella. Pneumoniae* ATCC 10031 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), pero no exhibió actividad contra *Enterococcus faecalis*. Los resultados de las pruebas in vivo sugieren que el extracto acuoso de Tarqui administrado de manera oral a ratones modelo evidencia que no existe efecto tóxico visible por no mostrar alteraciones en la bioquímica sanguínea de los ratones. El α -felandreno y α -pineno, identificados en el aceite esencial de Tarqui, serían los responsables de los usos etnomédicos como broncodilatador y anti-inflamatorio como lo demuestra el presente estudio, abriendo la posibilidad de la producción de los llamados fitofármacos.

Palabras clave: Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), aceite esencial, fitoquímica, principios activos, microbiología, metabolitos secundarios, cromatografía, elucidación estructural, α -felandreno, α -pineno.

ABSTRACT

The objective of this research was to determine the active principles of real and / or potential value, of the native forest species Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), in the forest of Jacarón, Juan de Velasco, Chimborazo, Ecuador, because it is considered a plant species with possible medicinal properties whose infusion of fresh leaves has been used ancestrally to control conditions associated with the digestive and respiratory tract. In the case of the Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), reports have not been found about its ethnomedical activity. To carry out this research, Tarqui leaves (*Hedyosmum luteynii* Todzia) were selected from the altitudinal level 2 of the forest. In the phytochemical screening saponins, phenols and terpenes were identified in greater quantity and few flavonoids. In the analysis of the essential oil, 28 compounds were found, which correspond to 98.62% of the total of the constituents. Most of these compounds are monoterpene natural hydrocarbons (83.21%). In order of abundance are: “ α -phellandrene (32.72%), α -pinene (13.20%), (Z) - β -ocimene (10.99%), wild-type (6.51%), bicyclogermacrene (5.05%), 1, 8-cineole (4.95%), (E) - β -ocimene (3.88%) and germacrene D (3.20%)”. The essential oil of Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) inhibited the development of Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) and Gram negative (*Escherichia coli* ATCC: 25922, *Klebsiella*, *Pneumoniae* ATCC 10031 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), but did not exhibit activity against *Enterococcus faecalis*. The results of the in vivo tests suggest that the aqueous extract of Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) administered orally to model mice demonstrates that there is no visible toxic effect due to not showing alterations in the blood biochemistry of the mice. The α -phellandrene and α -pinene, identified in the essential oil of Tarqui would be responsible for the ethnomedical uses as bronchodilator and anti-inflammatory as evidenced by the present study, opening the possibility of the production of the so-called phytopharmaceuticals.

Key words: Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), essential oil, phytochemistry, active principles, microbiology, secondary metabolites, chromatography, structural elucidation, α -phellandrene, α -pinene.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Situación problemática

Los bosques de la cordillera andina del Ecuador y Latinoamérica se constituyen en un recurso ancestral utilizados en los sistemas de salud de los países de América Latina, por tener un potencial en cuanto a productos forestales no maderables que poseen las especies nativas (Hórak (Ed.), 2015). El conocimiento ancestral ha sido transmitido por generaciones, este es el principio por el cual la etnobotánica trata de entender las interacciones culturales, grupos humanos, hechos históricos que han marcado el inicio y el final de las civilizaciones y su interacción con la botánica (Chandrasekharan, Frisk y Campos, 1996).

La palabra “etnobotánica” ha sido utilizada a partir del año 1895, por el profesor de la Universidad de Pennsylvania, William Harshberger, pero hay reportes que esta ciencia se ha practicado desde el inicio de las civilizaciones en todo el mundo (Aguirre, Cabrera, Sanchez, Merino, & Maza, 2003; De la Torre, Muriel, & Balslev, 2006), con la finalidad de encontrar recursos, material genético, el descubrimiento de nuevos productos farmacéuticos o ingredientes activos para el desarrollo de productos que sean utilizados en beneficio de la salud de las personas (Bernal, García, Londoño, Molano, Quevedo & Vásquez, 2011).

Los bosques andinos se ubican generalmente en rangos altitudinales que van desde los 2700 hasta los 3800 msnm¹; estructurando parches y remanentes de extensos bosques (Luteyn, 2000). Por tanto la estructura y dimensión son diferentes debido a múltiples factores que han modelado su entorno, por ejemplo: microclimas provocados por la topografía, tipo de suelo, estructura mineralógica y condiciones de adaptación ante factores externos, que definitivamente han incidido en una diferenciación de los componentes químicos pertenecientes a cada especie (Luteyn, 2000).

El género *Hedyosmum*, pertenece a un tipo de especie vegetal vascular nativa de la familia Chloranthaceae, clase Equisetopsida y orden Chloranthales; la especie *Hedyosmum luteynii* Todzia, conocida con el nombre vernáculo en lugares de la Sierra centro del Ecuador como “Tarqui o borracho” (Caranqui, 2017).

Las propiedades medicinales conferidas a este género son ancestrales, sus hojas frescas y maduras han sido utilizadas en forma de infusión para controlar afecciones de salud relacionadas al tracto digestivo (Chandrasekharan et al., 1996); sus componentes químicos se han estudiado en diferentes especies, pero para el caso del Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), no se han encontrado reportes sobre su actividad etnomedicinal (De La Torre, Muriel, & Balslev, 2006; Luteyn, 2000).

En base a lo mencionado, la presente investigación da a conocer un estudio del Tarqui y el rol que cumple siendo una especie nativa del Bosque Forestal de “Jacarón”. Esto pone de manifiesto la existencia de una fuente de Productos Forestales no Maderables (PFNM²), los mismos que desempeñan un papel importante en la vida y bienestar de las comunidades indígenas y campesinas del sector al que se pertenecen (ECOBONA, 2010).

¹ m.s.n.m.: metros sobre el nivel del mar

² PFNM: Productos Forestales No Maderables

Es necesario manifestar que los PFSM, contribuyen a un mejor manejo y conservación de los ecosistemas, especialmente de los bosques de la cordillera andina del Ecuador y específicamente en este estudio del bosque de “Jacarón”; estableciendo un nexo directo entre el uso racional y la mitigación de los procesos de degradación, con su relación e incidencia con el cambio climático global (ECOBONA, 2010).

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

¿Cuáles son los principios activos de valor real y/o potencial que contiene la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), del bosque de Jacarón, Juan de Velasco, Chimborazo, Ecuador, para establecer su posible utilidad medicinal o industrial?

1.2.2. Problemas específicos

1. ¿Cuál es el tipo de hoja de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) en base a su grado de madurez y del piso altitudinal del bosque de Jacarón, que permita evidenciar la mayor presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios?

2. ¿Cuál es el extracto fitoquímico de las hojas seleccionadas de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum Luteynii* Todzia) cuyos grupos de metabolitos secundarios presenten la mejor actividad antibacteriana?
3. ¿Cuál es la concentración del extracto fitoquímico seleccionado de las hojas de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum Luteynii* Todzia), que contenga los grupos de metabolitos secundarios con el mayor grado de inhibición del crecimiento bacteriano para establecer su utilidad medicinal?

1.3. Justificación teórica

El uso de las plantas se remonta a épocas que datan de 5.000 mil años antes de Cristo, donde se conocen se establecieron los primeros asentamientos humanos; su uso como medicina se lo considera como un evento: acierto - error; al igual que los animales, éstos utilizaron de forma empírica los beneficios de las plantas debido a la presencia de metabolitos, principios activos, propiedades específicas en diferentes y variados usos, para mitigar afecciones en el metabolismo humano o curar sus enfermedades (Barquero, 2007).

Siempre se ha evidenciado una estrecha relación entre los seres humanos y la naturaleza, misma que ha generado un conocimiento sin precedentes a lo largo de la historia, hasta llegar a convertirse en la posibilidad de aprovechar al máximo las propiedades de las plantas en el uso cotidiano (Barquero, 2007).

A la Etnobotánica, se la considera como la ciencia que estudia el uso de las plantas y su relación con las culturas (Hórak (Ed.), 2015); la etimología de este término viene de: etnología (cultura) y botánica (referido al estudio de las plantas). Los estudiosos de esta línea determinaron dos perspectivas en relación a esta ciencia, la primera consiste en una praxis o utilidad del uso de las plantas,

mientras que la segunda perspectiva persigue establecer un carácter filosófico (Bernal et al., 2011).

Suárez (2008) manifiesta que “la relación o interacción entre el hombre y el mundo de las plantas se manifiesta en la influencia que poseen las plantas en la cultura humana”.

Por evidencias se conoce que el uso de las plantas antes de existir la escritura como tal, se transmitía de generación en generación, llegando al punto de considerarlas en algunas culturas como plantas sagradas (Suárez, 2008). La evidencia verificable del uso de las plantas como fuente de medicina se remonta hacia unos 60000 años, en una cueva de Iraq, donde en 1960 se establecieron descubrimientos en huesos humanos que evidenciaron grandes cantidades de residuo de polen (Suárez, 2008). En la actualidad varias de estas plantas consideradas como especies medicinales, siguen siendo utilizadas (Suárez, 2008).

Uno de los casos documentados en la historia de América Latina, fue el uso de la especie *Cinchona officinalis*, que durante el siglo XVII y gran parte del siglo XVIII, revolucionó la farmacología, debido a sus propiedades terapéuticas, esta planta fue utilizada en los países europeos para tratar la malaria (Vidaurre, 2006).

El Ecuador se destaca por poseer una gran diversidad de especies vegetales con un enorme potencial de uso farmacológico, muchas de ellas todavía no han sido estudiadas (Azócar y Rada, 2006). La diversidad de la vegetación podría deberse o ser producto de la gran variedad de factores bióticos, geológicos y antrópicos ancestrales que han sido conjugados a través del tiempo (Azócar y Rada, 2006).

En el Ecuador, los bosques montanos de ceja andina corresponden a una extensión aproximada de 1844,91 ha; distribuidos en la zona de páramo que contiene casi el 30% de las especies de plantas vasculares (Mena, Medina y Hofstede, 2001), esto demuestra la gran importancia que tiene este ecosistema y la necesidad de establecer políticas de ordenamiento territorial y gestión

ambiental de los recursos forestales, para la mitigación frente al inminente proceso del cambio climático y la necesaria conservación de los recursos naturales (Cordero, Moreno & Kosmus, 2008).

El género *Hedyosmum*, correspondiente a la familia Clorantaceae, compuesta por 40 especies, que se encuentran presentes principalmente en ecosistemas ubicados en la cordillera alto andina y en bordes de la vegetación neotropical de los andes; por lo que hay evidencias que el género *Hedyosmum* está presente desde México a través de América Central hasta Bolivia (Todzia, 1988). La mayor diversidad del *Hedyosmum* se encuentra en el norte de los Andes donde se hallan más del 50% de todas las especies (Todzia, 1988). En Ecuador se encuentran registradas 15 especies, de las cuales 12 de ellas se distribuyen en los bosques andinos y subparamos (Zaruma, 2015).

1.4. Justificación práctica

El continuo uso de los productos forestales no maderables permite que exista el principio de conservación de bosques en zonas de vulnerabilidad; más allá de la búsqueda de los principios activos presentes en las plantas se debe ampliar la investigación al conocimiento ancestral, a las buenas prácticas de uso y conservación de los recursos forestales de la zona andina, recursos que han sido depredados por la intervención antrópica (ECOBONA, 2010).

La presente investigación planteó como hipótesis de partida determinar si la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), presente en el bosque de Jacarón, de la parroquia Juan de Velasco y que ha sido utilizada por los indígenas del sector como planta medicinal para tratar afecciones respiratorias y úlceras estomacales; tiene principios activos que le proporcionen esa actividad y que basado en el conocimiento científico moderno se dé a

conocer a esta especie como un potencial fitofármaco (Burbano, Apugllón y Burbano, 2014).

Para conseguir esta respuesta se seleccionó el material vegetal de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia): hojas desarrolladas, con la finalidad de realizar la caracterización etnobotánica para posteriormente preparar y purificar los extractos, para la determinación de los metabolitos secundarios que fueron identificados a través de reacciones químicas establecidas en los estudios fitoquímicos. La determinación estructural de los compuestos se lo realizó por medio de técnicas instrumentales y espectroscópicas. El valor real y/o potencial de la especie en estudio fue evaluado y cuantificado a través de técnicas microbiológicas y toxicológicas in vivo.

Este proyecto forma parte de un convenio entre la Universidad Nacional de Chimborazo y el Ministerio del Ambiente del Ecuador, mismo que tiene como premisa fundamental rescatar los conocimientos ancestrales de uso de las plantas, buscando la forma de establecer políticas de manejo y aprovechamiento sostenible de productos forestales no maderables, la restauración forestal en zona vulnerables y producción de recursos ecosistémicos, que beneficien de manera directa a los pobladores del sector, estableciendo un modelo de manejo de bosques andinos en el Ecuador.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Determinar de los principios activos de valor real y/o potencial de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum Luteynii* Todzia); bosque de Jacarón, Juan

de Velasco, Chimborazo - Ecuador”, para establecer su posible utilidad medicinal o industrial.

1.5.2. Objetivos específicos

1. Determinar el tipo de hoja en base a su grado de madurez y del piso altitudinal del bosque de Jacarón, que permita evidenciar la mayor presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios.
2. Determinar el extracto fitoquímico de las hojas seleccionadas de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum Luteynii* Todzia) cuyos grupos de metabolitos secundarios presenten la mejor actividad antibacteriana.
3. Determinar la concentración del extracto fitoquímico seleccionado de las hojas de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum Luteynii* Todzia), que contenga los grupos de metabolitos secundarios con el mayor grado de inhibición del crecimiento bacteriano para establecer su utilidad medicinal.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación

Brack (1997) indicó que: “La humanidad desde sus inicios dependió para su supervivencia de la utilización de los vegetales, mismos que le ayudaron a cubrir sus necesidades básicas de alimento, vestido y vivienda”. En el mundo se encuentran más de 270000 especies de plantas, de las cuales aproximadamente 7000 se han usado en forma silvestre o han sido cultivadas por los humanos para servir como aliemento (Brack, 1997). El resto de especies, es decir, aproximadamente 30000 especies, no se han usado como alimento debido a la falta de interés o conocimiento de sus posibles usos (Brack, 1997).

Antes de que la agricultura surgiera como una actividad imprescindible para la supervivencia humana, ya se observaba que las plantas y la humanidad tenían una estrecha relación entre sí (Balslev, Navarrete, De la Torre, Muriel y Macía, 2008). Mediante la recolección se usaba a las plantas como alimento, además sirvieron como materiales básicos para la producción de artículos como ropa, colorantes, fármacos, etc. (Balslev et al., 2008).

A medida que se incrementaba la población humana, se generaba la necesidad de tener conocimiento científico de aquellas especies vegetales que aún no han sido estudiadas pero si utilizadas por el hombre (Balslev et al., 2008). Por lo que para dar continuidad a los diferentes estudios que permitieron mejorar la

medicina moderna, se plantea el manejo apropiado de la administración ambiental (Balslev et al., 2008). Esto con el propósito de promover un aprovechamiento sostenible de aquellas especies empleadas en la industria alimenticia, textil, farmacéutica y otras (Balslev et al., 2008).

Una vez identificadas aquellas especies vegetales que muestran potencial económico, lo más importante es añadirlas a la lista de especies de uso humano, para permitir su explotación y aprovechamiento (Balslev et al., 2008). Muchas personas no pueden acceder a medicamentos químicos, debido a la mala condición económica de los países subdesarrollados, así la Organización Mundial de la Salud (OMS³) propuso un programa global para que la herbolaria y los conocimientos ancestrales sean una alternativa en la salud pública (Balslev et al., 2008).

En varios países del mundo existe un amplio uso de la medicina tradicional e incluso es promovido y apoyado por parte de sus gobiernos, siendo alto el consumo de plantas medicinales para tratar varias afectaciones de salud inclusive en países considerados desarrollados (Balslev et al., 2008). Es indiscutible que las plantas de uso medicinal son muy importantes, tanto para el desarrollo de la sociedad como para la medicina actual (Balslev et al., 2008). De las plantas provienen aproximadamente el 25% de la medicina (75% arbolados tropicales), muchos de ellos considerados como anticancerígenos (Balslev et al., 2008).

Como ejemplo se puede mencionar que el cardiotónico más común en los tratamientos médicos occidentales es el estimulante cardíaco Digitoxina, el cual es extraído de la "*Digitalis L. Scrophulariaceae*" (Sales, Nebauer, Mus, & Segura, 2001). La leucemia infantil ha sido tratada mediante la "Vincristina sintética", con sólo el 20% de eficacia comparado con el producto extraído del "*Catharanthus roseus G. Don*" (Apocynaceae) (Singh, Vats, Suri, Shyam, Kumria, Ranganathan & Sridharan, 2001). Se asume que esto se debe a que los principios activos de las plantas funcionan de forma sinérgica, es decir, actúan coordinadamente en

³ OMS: Organización Mundial de la Salud

los organismos donde complementan, potencian o neutralizan algún efecto maligno (Balslev, Vats, Suri, Shyam, Kumria, Ranganathan, & Sridharan, 2008).

La industria farmacéutica ha puesto particular empeño en realizar estudios en especies vegetales, para determinar sus principios activos, los cuales generan reacciones bioquímicas y conllevan a dar cura de las enfermedades, validando de este modo el conocimiento tradicional (Berdonces, 1995). Simultáneamente, en estos estudios se ha podido establecer que algunas plantas no tienen efectos curativos, sino que podrían generar afecciones en la salud de los humanos (Berdonces, 1995).

A un principio activo se le conoce como una sustancia de composición química definida que produce una acción fisiológica específica en un organismo (Berdonces, 1995). Algunos de los considerados importantes son los grupos funcionales como los alcaloides, glucósidos, vitaminas, ácidos grasos esenciales, taninos, minerales, flavonoides saponinas y resinas (Berdonces, 1995). Los principios activos se pueden hallar tanto en la especie vegetal completa, como solo en algunas partes de ella como en las hojas, flores, semillas, frutos, raíces y hasta en la misma corteza (Berdonces, 1995).

Ancestralmente, para preparar un remedio casero se han secado plantas porque se considera que se consigue más concentración de los principios activos que en las plantas que aún están frescas (Zambrano, Buenaño, Mancera y Jiménez, 2015). Su administración incluye: infusiones, decocciones, cataplasmas, ungüentos o aceites. Como es de conocimiento general las plantas con una extensa variedad de propiedades aún pueden conseguirse en yerberas y mercados, en presentaciones como pomadas, polvos, ungüentos, extractos y cápsulas (Zambrano et al., 2015). Generalmente estos productos indican que “Este producto no es un medicamento” o “complemento alimenticio”, para obedecer a los requisitos exigidos por la “Ley General de Salud” y su control de sanidad para servicios, actividades, productos y establecimientos que intervienen en éste ámbito (Zambrano et al., 2015).

2.2. Antecedentes de investigación

Cañigüeral, Dellacassa, y Bandoni (2003), consideran que “más del 70% de la población mundial recurre a las plantas para tratar enfermedades. La industria farmacéutica ha obtenido del reino vegetal la materia prima necesaria para elaborar casi el 30% de los productos farmacéuticos de la medicina moderna”. Hoy conocemos que los boscajes tropicales en el mundo son fuentes de enormes bancos de germoplasma de especies vegetales consideradas como medicinales, que poseen un enorme potencial para contribuir con la medicina moderna (Cañigüeral et al., 2003).

En Ecuador, de manera similar a otros países de los Andes, la medicina tradicional ha sido muy utilizada por varias generaciones hasta la actualidad (Balslev et al., 2008). Esta medicina es generalmente usada por los pueblos con menos ingresos monetarios, así como campesinos, mestizos e indios, puesto que confían en los conocimientos tradicionales como una solución barata y asequible para sus necesidades (Balslev et al., 2008).

Como ejemplo de investigación fitoquímica en el Ecuador y en el mundo se puede considerar: “La investigación fitoquímica e identificación de principios activos en seis especies del género *Baccharis*”, realizada por Miño (2007) en la ESPE, Sangolquí, Quito, Ecuador. Otro ejemplo de investigación en ésta área es la “Caracterización fitoquímica, actividad antibacteriana y antioxidante de extractos de plantas medicinales utilizadas en Pereira y Santa Rosa de Cabal” (Hernández, 2011); en donde se establecieron las plantas medicinales más usadas en Pereira y Santa Rosa de Cabal (Risaralda); estas fueron el cedrón (*Aloysia triphylla*), la ortiga (*Urtica dioica*), el toronjil (*Melissa officinalis*), la malva (*Malva sylvestris*) y el perejil (*Petroselinum sativum*) (Hernández, 2011). Después se obtuvieron extractos de n-hexano, diclorometano y metanol de estas variedades, para probar su actividad antibacteriana, pero ninguno mostró actividad antibacteriana significativa (Hernández, 2011).

En el trabajo realizado por Morocho (2015), “Valoración ecológica y análisis fitoquímico del aceite esencial de *Hedyosmum scabrum*, en la provincia de Loja, Ecuador”, se determinó la composición química de los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación de hojas frescas de *Hedyosmum scabrum*, y se detectaron un total de 93 componentes, que representan 94,8% y 95,3%. Los constituyentes prevalentes en el *Hedyosmum scabrum* macho, fueron pinocarvona (13,1%), d-germacren-4-ol (12,6%), 1,8-cineol (10,8%), α -pineno (6,4%) y β -pineno (4,8%), mientras que los principales componentes de *Hedyosmum scabrum* hembra fueron 1,8-cineol (20,5%), linalool (16,5%), α -pineno (15,0%), β -pineno (6,4%) y sabineno (6,3%) (Hernández, 2011).

2.2.1. Investigación de productos naturales de plantas de Ecuador con posible actividad biológica en seres vivos

Los productos obtenidos de fuentes naturales: de plantas, animales, microorganismos y otros, se los conoce como Metabolitos Secundarios o especiales y la Química a través de sus diferentes áreas los ha estudiado especialmente en su funcionalidad y aplicación médica (Berdonces, 1995). Los llamados metabolitos secundarios son compuestos orgánicos que se producen en el “metabolismo secundario” de los seres vivos como respuesta a afectaciones o incidencias externas de las cuales el organismo pretende defenderse. Estos compuestos presentan diferente masa o peso molecular (PM⁴), (Berdonces, 1995). Los metabolitos secundarios se constituyen en compuestos químicos de gran importancia, debido a que sus variadas estructuras químicas les confieren las posibles actividades biológicas evidenciadas en los organismos en donde se desarrollan (Berdonces, 1995).

Estos compuestos orgánicos llamados metabolitos secundarios suelen poseer una estructura química con pesos moleculares que van de intermedios a altos y los más comúnmente conocidos son los terpenos, alcaloides, taninos,

⁴ PM: Peso Molecular

saponinas, flavonoides, glucósidos, antocianinas y oligoelementos, entre otros (Berdonces, 1995). Además, se encuentran los metabolitos secundarios con peso molecular elevado como las proteínas y sus unidades fundamentales los péptidos, los que se cree se generan por circunstancias excepcionales del organismo productor (Berdonces, 1995).

Las etapas generalmente planteadas por la mayoría de los estudiosos de la llamada Fitoquímica indican que para la obtención de los metabolitos secundarios provenientes de los vegetales, se lo puede realizar cumpliendo cuatro etapas fundamentales: La extracción de las sustancias, su posterior aislamiento, la purificación de los compuestos posiblemente activos y su determinación o elucidación estructural. Para cumplir con cada una de las etapas mencionadas, existen diversas técnicas químicas, físicas e instrumentales (Berdonces, 1995). Cabe mencionar que para la comprobación de la actividad biológica de los metabolitos secundarios se cuenta con una amplia gama de métodos basados en tratamientos de laboratorio biológicos y microbiológicos (Berdonces, 1995).

La Química Estructural ha desarrollado múltiples técnicas y metodologías entre las que se pueden mencionar la Resonancia Magnética Nuclear (RMN⁵), la Espectroscopia de Masas (EM⁶), la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC⁷), la Cromatografía Gas-Líquido (CGL⁸), la Electroforesis Capilar (EC⁹), entre las más importantes (Gregorí, Guerra, Mieres, Alba, Brown, Rangel-Vázquez, Sosa y De la Hoz, 2008).

Lógicamente que para la búsqueda de la comprobación de la actividad biológica de los metabolitos secundarios presentes en organismos vivos se debe apoyar en las Ciencias duras y tradicionales como son la Química Orgánica, la Bioquímica, la Biología con sus diferentes especialidades, la Fisicoquímica, e incluso el Laboratorio Clínico y la misma Medicina como tal (Gregorí et al., 2008).

⁵ RMN: Resonancia Magnética Nuclear

⁶ EM: Espectroscopia de Masas

⁷ HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

⁸ CGL: Cromatografía Líquido-Gas

⁹ EC: Capilar Electroforesis.

En el presente siglo se ha visto un enorme desarrollo de Ciencias alrededor de la Genética como la Genómica, a las que se les llamó las "ómicas" (Gregorí et al., 2008). Así como también se observa la fusión y acople de las Ciencias como la Química con la Biología, con la Genética, con la Física y otras, generando múltiples tecnologías para tratamientos como la Electroforesis Capilar combinada con la Espectroscopia de Masas (EC-EM¹⁰), la Resonancia Magnética Nuclear integrada a la Electroforesis Capilar (EC-RMN¹¹), la Espectroscopia de Masas conjugada con la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPCL.EM/EM¹²), entre otras (Gregorí et al., 2008).

La Química como Ciencia ha tratado de descifrar la función de los metabolitos secundarios presentes en organismos vivos como los vegetales, para posterior aplicarlos en uso y beneficio de los seres humanos, para lo cual ha requerido el aliarse con otras Ciencias como la Botánica y la Ecología (Pomilio, 2012).



Figura 1: Etapas para la obtención de compuestos químicos de vegetales para uso biotecnológico. Fuente: (Pomilio, 2012).

¹⁰ EC-EM: Espectroscopia de Masas-Electroforesis Capilar

¹¹ EC-RMN: Resonancia Magnética Nuclear-Electroforesis Capilar

¹² HPLC-EM/EM: Cromatografía Líquida de Alta Resolución - Espectrometría de Masas tandem

El procedimiento de la figura anterior muestra las etapas del estudio de vegetales para determinación de metabolitos secundarios. En la primera parte que concierne a la extracción de los compuestos activos, se pueden aplicar diferentes metodologías de obtención dependiendo de la naturaleza del producto de partida, pudiendo ser extracción sólido-líquido (la más común) o también líquido-líquido de ser el caso (Pomilio, 2012). Una vez obtenidos los extractos vegetales donde se encuentran los compuestos químicos se procede a las etapas de aislamiento de los mismos y su necesaria purificación, a través de metodologías disponibles como las de Cromatografía con sus variedades, como la de Capa Fina (TLC), Cromatografía en Columna (HPLC), Cromatografía de Gases (CGL) (Pomilio, 2012).

La elucidación estructural de los compuestos químicos obtenidos emplea técnicas instrumentales como la Resonancia Magnética Nuclear ^1H y ^{13}C -NMR, Espectroscopia de Masas con sus diversos acoples a otras técnicas, así como también tecnologías tradicionales como análisis con lámparas Ultravioleta (UV) e Infrarroja (IR) (Pomilio, 2012).

2.2.2. Bioactividades de interés

Desde la antigüedad se ha conocido de cierta actividad biológica presentada por algunas plantas ante ciertos padecimientos o enfermedades, por lo que ha sido de mucho interés el conocer cómo actúan estos compuestos ante ciertas afectaciones como la aparición de tumores, presencia de virus, bacterias microorganismos en general, inflamaciones, degeneración celular o tal vez únicamente prevención de futuras enfermedades. Los análisis de la Estructura Electrónica y los estudios Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR¹³) tienen relación con Ciencias como la Química, Física, Biología, Microbiología, entre otras (Gregorí et al., 2008).

¹³ QSAR: Quantitative Structure Activity Relationship

De acuerdo a versiones emitidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se conoce que más del 80% de la población del mundo emplea extractos o partes de plantas para tratar sus afectaciones o enfermedades, haciendo uso de las propiedades de los vegetales y convirtiéndolos en productos llamados fitoterapéuticos o Fitomedicamentos (Gregorí et al., 2008).

En el campo de los productos naturales, se destacan algunos estudios sobre la actividad biológica presentada por los extractos de plantas o por sus partes, como por ejemplo el empleo de grupos funcionales como los flavonoides para inhibir el crecimiento del virus de la gripe o influenza H₁N₁¹⁴ (Gregorí et al., 2008).

Cuadro 1: Composición de aceites esenciales de especies del género *Hedyosmum* en términos de monoterpenos hidrocarburos (MH), monoterpenos oxigenados (MO), sesquiterpenos hidrocarburos (SH) y sesquiterpenos oxigenados (SO)

Especie	MH* %	MO* %	SH* %	SO* %	Compuestos mayoritarios	NCI*	Fuente/Usos medicinales
<i>Hedyosmum mexicanum</i> C. Cordem. Costa Rica–	42,2	7,2	11,9	22,4	Sabineno (28%); furanodieno (>20%); germacreno-B (4.7%); trans-mentona (3%)	39	Hojas (Mundina, Vila, Tomi, Ciccio, Ibañez, Adzet & Cañigüeral, 1999).
<i>Hedyosmum bonplandianum</i> Kunth –Costa Rica–	39,7	12,6	28,2	2,8	Sabineno (14.7%); β-bisabolene (10.3%); terpineol-4-ol (7%); spathulenol (1.4%)	51	Hojas (Mundina et al., 1999). Actividad analgésica (Cardenas, Rodríguez, Villaverde, Rigüera, Cadena, & Otero, 1992).
<i>Hedyosmum costaricensis</i> C.E. Wood ex W.C. Burger –Costa Rica–	3,8	0,7	62,6	7,2	Germacreno-D (32%); β-ocimeno (2.3%); α-cadinol (2.1%); linalol (0.7%)	29	Hojas (Mundina et al., 1999).

¹⁴ H1N1: inhibidores de neuraminidasa del virus

<i>Hedyosmum arborescens</i> Sw. Caribe Guadalupe–	–	46,6	12	21,2	15,3	α -felandreno (11.4%); bicyclogermacrene (10.6%); sabineno (9.7%)	50	Hojas. Actividad anticancerígena (pulmón y colon) (Sylvestre, Pichette, Longtin, De Ker, Bercion & Legault, 2007).
<i>Hedyosmum brasiliense</i> Mart. Ex Mid. Brasil–	–	38,1	15,3	10	29,4	Curzereno (17%); sabineno (16%); β -pineno (5%); eucalytol (3%); methyl eugenol (5%); carotol (6%)	50	Hojas. Migraña, hongos de los pies, reumatismo, dolor estomacal y diurético (Murakami, Cordeiro, Scotti, Moreno, & Young, 2017).
<i>Hedyosmum brasiliense</i> Miq. –Brasil–	15,7	28,6	18,6	27,1		α -terpinol (10.2%); curzereno (8.9%); β -thujene (7.1%); caratol (6.1%); spathulenol (5.3%)	65	Hojas. Sedante, febrífugo y como sustituto del té verde. Muestra actividad anticonceptiva (Kirchner, Wisniewski, Cruz, Biavatti, & Netz, 2010).
<i>Hedyosmum glabratum</i> Kunth Venezuela–	–	5,1	30,1	45,3	-	α -copaeno (12.8%); α -cubebeno (9.5%); borneol (6.8%); terpinol-4 (5.9%)	30	Hojas (Danis y Rojas 2012).
<i>Hedyosmum colombianum</i> Cuatrec. Colombia–	–	35,6	39,6	4,5	15,7	β -pineno (16.5%); pinocarvone (13.4%); curzerene (7.1%); (E) - β -ocimene (6.1%)	49	Hojas. Odorífera y aromatizante en alimentos en la zona andina (Delgado, Quijano, Morales, & Pino, 2010).
<i>Hedyosmum colombianum</i> Cuatrec. Colombia–	–	24,6	63,8	0,7	6	β -pineno (11.4%); pinocarvone (14.2%); terpinen-4-ol (9.8%); neral (9.7%)	49	Frutas. Odorífera y aromatizante en alimentos en la zona andina (Delgado et al., 2010).
<i>Hedyosmum translucidum</i> Cuatrec. Colombia–	–	21,5	15,5	19,2	38,5	α -eudesmol (11.4%), germacrene D (8.9%), trans- β -cariofileno (7.8%), elemol (5.8%) y óxido de cariofileno (5.3%)	52	Hojas. Relajamiento en parturientas, facilitador del sueño, bebidas tonificantes (Zamora-Burbano & Arturo-Perdomo, 2016).

<i>Hedyosmum angustifolium</i> (R. & P.) Solms-Laubach – Bolivia–	64	14,2	8	1,4	α -pineno (24%), β -pineno (23.5%); sabineno (6.4%); linalool (6.1%), eucaliptol (3.7%); germacreno-D (3.1%); spathulenol (1.1%)	32	Hojas. Antirreumático y tratamiento del resfriado (Lorenzo, Loayza & Dellacassa, 2003). Actividad anti-leishmaniasis (Acebey, Jullian, Sereno, Chevalley, Estevez, Moulis, Beck, Valentin, Gimenez, & Sauvain, 2010).
<i>Hedyosmum sprucei</i> Solms –Ecuador–	10,1	-	88,6	-	germacreno-D (23.16%); β -caryophylleno (15.53%); α -cadineno (5.50%); α -copaeno (5.08%); α -felandreno (3.48%).	58	Hojas. Conocida como “sacha limón panga,” “sacha limón caspa,” “hoja de monte.” Tratamiento de la mordedura de serpientes (Guerrini, Sacchetti, Grandini, Spagnoletti, Asanza & Scalvenzi, 2016).
<i>Hedyosmum scambrum</i> (R. et P.) Solms-Laubach – Bolivia–	3,4	3,4	25,9	2,6	germacreno-D (13%); δ -3-carene (12.1%); eucaliptol (5.7%); α -grujeno (6.6%); 3', 4'-Dimethoxypropiofenone (6.6%)	27	Hojas. Antirreumático y tratamiento del resfriado (Lorenzo et al., 2003).
<i>Hedyosmum scambrum</i> (R. & P.) Solms – Perú–	16,8	64	9,4	0	Estragole (55.8%); α -pineno (7.7%); Bicyclogermacrene (3.25)	50	Hojas. Antiespasmódico (De Feo & Urrunaga, 2013).
<i>Hedyosmum scambrum</i> (R. & P.) Solms – Ecuador–	21,1	56,1	21,1	0,8	eucalytol (29.9%); linalool (11.1%); α -pineno (10.9%); sabineno (4.3%)	76	Planta femenina. Dolor de estómago, preparación de bebidas aromáticas (Morocho, 2015).
<i>Hedyosmum scambrum</i> (R. & P.) Solms – Ecuador–	8	46,3	44,2	1,4	pinocarvone (14.7%); eucalytol (13.4%); linalool (6.1%); α -pineno (3.6%)	76	Planta masculina. Dolor de estómago, preparación de bebidas aromáticas (Morocho, 2015).

						Hojas colorado, Tarqui, guayusa granizo, majagua (Colombia), Canela congo.	Pururug borracho, cashco, andina, granicillo, y Dolor abdominal, diurético, diaforético, digestivo, afrodisíaco, antiséptico, neuralgia, reumatismo (United Nations Industrial Development Organization, 2006).
<i>Hedyosmum</i>							
<i>luteynii</i> Todzia	83,2	2,1	13,7	-		28	
-Ecuador-							
					α -felandreno (32.7%); α -pineno (13.2%); (Z)- β -ocimeno (11%); sylvestrene (7%).		

*Monoterpenos hidrocarburos (MH), monoterpenos oxigenados (MO), sequiterpenos hidrocarburos (SH) y sesquiterpenos oxigenados (SO). También, se listan los componentes mayoritarios, número de compuestos identificados (NCI) y usos en la medicina tradicional.

Fuente. Torres, Tovar, García, Lucena y Araujo, 2018

2.2.3. Perspectivas actuales y objetivos

La Etnobotánica se ha desarrollado profundamente en especial en las dos últimas décadas, en donde a través de investigaciones ha evidenciado la enorme pérdida del conocimiento ancestral sobre el uso adecuado de las plantas para prevenir y curar enfermedades, en contraposición del marcado deterioro de los bosques y espacios dónde crecen naturalmente estas especies (Prance, 1991; Cunningham, 1996); Caniogo and Stephen, 1998). La etnobotánica ha contribuido a fortalecer en gran medida el campo teórico y a evidenciar su papel preponderante en incidir e insistir en la necesidad de conservar la diversidad biológica y propender al desarrollo sostenible y sustentable de los hábitats naturales (Davis, Wragge, & Reich, 1998; Prance, 1991; Cotton, 1998). Como

contribuciones de la Etnobotánica que se pueden destacar podemos indicar las siguientes:

- El empleo de metodologías con cuidado ambiental y ecológico para minimizar el impacto que causa la intervención humana en los espacios donde se encuentran las plantas con uso medicinal (Hall and Bawa, 1993).
- El documentar cronológica y técnicamente metodologías que han presentado buenos resultados en la manipulación de especies vegetales, y que sobre todo tienen procedimientos de preservación y uso sustentable de los ecosistemas, muchos de ellos de fragilidad impresionante (Prance, 1991; Bermúdez, Oliveira and Velázquez, 2005).
- El innovador reconocimiento de los derechos de la propiedad intelectual de los pueblos nativos sobre su conocimiento del uso tradicional de los recursos naturales, así como al desarrollo de estrategias que conlleven a retribuir a las comunidades por su directa participación en las investigaciones etnobotánicas (Cunningham, 1996; Caballero, Casas, Cortés y Mapes, 1998)
- La propuesta de realizar un trabajo inter y multidisciplinario (Bermúdez et al., 2005; Sylvestre et al., 2007).
- El carácter interdisciplinario de la etnobotánica se evidencia en las investigaciones en el campo de la etnofarmacología - bioprospección (Adersen and Henning, 1997; Balslev et al., 2008; Bermúdez et al., 2005), agroecosistemas-desarrollo sostenible y biogeografía-conservación de la biodiversidad (Phillips, Gentry, Reynel, Wilkin & Gálvez, 1994; Bermúdez et al., 2005; Lasso, Señaris, Alonso y Flores, 2006; Yepes, Jaramillo, Valle y Orrego, 2007; Carreño, 2016).

Bermúdez et al. (2005), plantean que en las investigaciones etnobotánicas recientes puede visibilizarse una estructura conceptual de un estudio que contempla como actor importante el sujeto (hombre) con todas sus implicaciones

morales, éticas, científicas, religiosas e influyendo fuertemente en el objeto (plantas) y en la naturaleza donde se encuentran ambos actores.

(Bermúdez et al., 2005), proponen utilizar todos los conocimientos tanto ancestrales como científicos para generar una Etnobotánica diferenciadora, que valore la sabiduría de los pueblos en cuanto refieren el uso de las especies vegetales para beneficio de la salud de los seres humanos, pero con profunda convicción de cuidado y preservación de la biodiversidad evidenciada en los bosques, llanuras, ríos, etc., donde las comunidades y sociedades posean una amplia conciencia del uso racional de la naturaleza.

Álvarez, Gálvez, y Salazar (2016), plantean que se debe propiciar el desarrollo de la Etnobotánica y sus investigaciones, encaminadas a conocer el uso y empleo de las especies vegetales a partir de la conexión con los habitantes del sector, su involucramiento, participación e incluso en que reciban los “beneficios” que podrían generar tales actividades.

Por lo tanto considerando los criterios anteriormente expuestos, cuando se trate de desarrollar investigaciones sobre especies vegetales de uso medicinal o terapéutico, y que se conoce que han sido de amplio uso de esa comunidad en particular se debe empezar por poner en consideración de la Comunidad correspondiente para continuar con la interacción que lleve a la consecución de la información necesaria sobre la/s especie/s a ser estudiada/s, registrar sus datos conocidos y reportados por los moradores como el nombre con el que se le conoce, su hábitat natural, sus propiedades, fenología, usos, formas y modos de empleo, lo que permitirá el diseñar el estudio fitoquímico que lleve al conocimiento de los compuestos químicos que le proporcionan el carácter de medicinal (Cañigüeral et al., 2003).

Las investigaciones etnobotánicas deberán implicar el recolectar la mayor cantidad con la mejor calidad de información acerca de la especie vegetal tratada, pero deberá ir más allá hasta involucrarse con la determinación del impacto ambiental que conlleva el estudio y su respectivo tratamiento para minimizarlo (CORANTIOQUIA, 2006)

Inclusive proponer y desarrollar el correspondiente reconocimiento de la participación de la comunidad, en la realización de las investigaciones etnobotánicas (Hórak (Ed.), 2015).

2.2.4. *El conocimiento tradicional documentado*

Los proyectos de carácter etnobotánico deberán iniciar por la recopilación de la mayor cantidad de información correspondiente a la utilización ancestral de la especie vegetal o de sus partes, empleadas tradicionalmente para mitigar dolencias o enfermedades de los miembros de una comunidad (Pérez y Matiz, 2017).

En el evento realizado por los Países de Latinoamérica: La Conferencia de las Naciones Unidas desarrollado en Rio de Janeiro, en el año 1992, donde se suscribió el Convenio sobre la Diversidad Biológica, documento que contempla fundamentos y principios de carácter legal que procuran la conservación y sobre todo la protección de los recursos naturales, la “declaración de la soberanía sobre el patrimonio genético”, la regulación del uso de los recursos genéticos, el reconocimiento de la propiedad intelectual de los conocimientos ancestrales del uso y empleo de las plantas medicinales, entre otros aspectos (Zent, Zent y Marius, 2003).

Al iniciar un proyecto que implique el estudio de una especie vegetal, se deberá considerar de necesidad primaria de generar un clima de confianza, comunicación eficaz y cordial entre los investigadores y los miembros de la comunidad, quienes algunos de ellos serán personajes claves en la recolección de la especie vegetal y en particular en informar sobre el uso tradicional de la planta o de sus partes (Bermúdez et al., 2005; De La Torre et al., 2006).

Una de las metodologías usadas en esta etapa de recolección de la información de la especie vegetal en estudio, tiene mucha relación con la Antropología, que trata sobre el comportamiento humano, por lo que será necesario utilizar técnicas

como la observación, entrevistas, encuestas y otras, que permitan conocer la opinión y versión de los miembros de la comunidad (Pérez y Matiz, 2017; Carreño, 2016). Al respecto, Carreño (2016) propone un Manual que contiene procedimientos que permiten obtener la información que se requiere sobre la especie vegetal en estudio. Además se deberá considerar metodologías establecidas para la recolección, tratamiento e identificación de las especies vegetales (Bermúdez et al., 2005; Salazar, 2012).

2.2.5. Determinaciones cuantitativas

La Etnoecología como ciencia propone procedimientos que ayudan en el conocimiento de la abundancia relativa y distribución de una especie vegetal en particular, así como los principios para su uso y explotación adecuada, partiendo de los conocimientos ancestrales y basados en técnicas modernas para su uso y preservación (Berdonces, 1995).

Las metodologías empleadas para el análisis cuantitativo de los datos generados en las investigaciones etnobotánicas son variadas y permiten determinar la importancia del especie vegetal y la incidencia en el contexto mismo de la comunidad y del desarrollo de sus miembros (Berdonces, 1995).

Dentro de las técnicas ecológicamente propuestas para el estudio de una especie vegetal se deben considerar aquellas que toman en cuenta su entorno e influencia en la comunidad a la que se pertenece, tratando siempre de que la afectación e impacto al ambiente sea el menor y el que menos afecte, por ejemplo el muestreo por parcelas (Mora, 2000; Artigas y Díaz, 2013).

2.2.6. Evaluación fitoquímica, farmacológica y toxicológica

Al realizar el estudio de una especie vegetal, se deberá considerar la información obtenida inicialmente de los miembros de la comunidad, lo que determinarán los procedimientos químicos, físicos, biológicos y microbiológicos para la obtención de los principios activos, que les confieren las propiedades medicinales a las especies vegetales (Frei, Heinrich, Herrmann, Orjala, Schmitt & Sticher, 1998). Una vez seleccionada la planta medicinal de interés se evalúa de manera experimental obteniendo sus extractos, aislándolos, purificándolos y llegando a la determinación de sus estructuras químicas, como a su actividad microbiológica y biológica, que podría confirmar o denegar las versiones emitidas por los informantes de la comunidad (Frei et al., 1998).

2.2.7. Propuestas de compensación a la comunidad

La comunidad participante en investigaciones Etnobotánicas necesitan del reconocimiento correspondiente por su contribución con la ciencia en el uso de las especies vegetales en beneficio de la salud pública, por lo que una manera es considerar la propiedad intelectual sobre el conocimiento ancestral de los usos de las plantas medicinales por parte de los miembros de dicha comunidad (Bermúdez et al., 2005; Álvarez et al., 2016).

Las compensaciones podrían ofrecer a las comunidades locales por ejemplo el fortalecimiento de los sistemas comúnmente utilizados para la producción agrícola, campañas para promover el uso y la explotación adecuada de las especies vegetales de importancia y mantener vivo el cuidado de nuestra biodiversidad y naturaleza (Sylvestre et al., 2007).

En algunos países la fuente natural de especies vegetales utilizadas por sus propiedades curativas ha sido exterminada, destruido por completo el hábitat natural debido a una explotación descontrolada y sin técnica alguna. Por lo que

se hace necesario revertir esta realidad a través de la concienciación de todos los miembros de las comunidades, mediante proyectos que conlleven a la conservación de la naturaleza con todas sus partes conformantes como son los bosques, llanuras, ríos y áreas naturales en general, donde se encuentran la especies vegetales de interés (Ansaloni, Wilches, León, Peñaherrera, Orellana, Tobar y De Witte, 2010; Azuero, Jaramillo, San Martín y D'Armas, 2016).

2.3. Bases teóricas

2.3.1. Distribución de la especie *Tarqui* (*Hedyosmum luteynii* Todzia) en la región andina

El género *Hedyosmum* está ampliamente distribuido en la región andina, ha sido reportado en los países de Ecuador y Colombia (Jørgensen, & León-Yáñez (Eds.), 1999), establecidos en las estribaciones del flanco occidental de la cordillera central andina (siguiente Cuadro).

Cuadro 2: Distribución de la especie *Hedyosmum luteynii* Todzia

País	Sector	Autor	Año
Colombia		Todzia C. A.	1988
Colombia		Luteyn J. L.	1999
Colombia	Cauca	Todzia C. A.	1988
Colombia	Nariño	Todzia C. A.	1988
Colombia	Tolima	Todzia C. A.	1988
Colombia	Valle del Cauca	Todzia C. A.	1988
Ecuador		Todzia C. A.	1990
Ecuador		Todzia C. A.	1988
Ecuador		Jørgensen P. M. & C. Ulloa Ulloa	1994

Ecuador		SPECIMEN BASED RECORD	No data
Ecuador	Azuay	Jørgensen P. M. & C. Ulloa Ulloa	1994
Ecuador	Azuay	Jørgensen P. M. & S. León-Yáñez	1999
Ecuador	Azuay	Todzia C. A.	1990
Ecuador	Carchi	Todzia C. A.	1990
Ecuador	Carchi	Todzia C. A.	1988
Ecuador	Carchi	Jørgensen P. M. & C. Ulloa Ulloa	1994
Ecuador	Carchi	Jørgensen P. M. & S. León-Yáñez	1999
Ecuador	Cotopaxi	Todzia C. A.	1990
Ecuador	Cotopaxi	Todzia C. A.	1988
Ecuador	Cotopaxi	Jørgensen P. M. & C. Ulloa Ulloa	1994
Ecuador	Cotopaxi	Jørgensen P. M. & S. León-Yáñez	1999
Ecuador	Imbabura	Todzia C. A.	1990
Ecuador	Imbabura	Todzia C. A.	1988
Ecuador	Imbabura	Jørgensen P. M. & C. Ulloa Ulloa	1994
Ecuador	Imbabura	Jørgensen P. M. & S. León-Yáñez	1999
Ecuador	Loja	Todzia C. A.	1990
Ecuador	Loja	Jørgensen P. M. & S. León-Yáñez	1999
Ecuador	Morona-Santiago	Todzia C. A.	1990
Ecuador	Morona-Santiago	Todzia C. A.	1988
Ecuador	Morona-Santiago	Jørgensen P. M. & C. Ulloa Ulloa	1994
Ecuador	Morona-Santiago	Jørgensen P. M. & S. León-Yáñez	1999
Ecuador	Napo	Todzia C. A.	1988
Ecuador	Napo	Jørgensen P. M. & C. Ulloa Ulloa	1994
Ecuador	Napo	Jørgensen P. M. & S. León-Yáñez	1999
Ecuador	Pichincha	Todzia C. A.	1990
Ecuador	Pichincha	Jørgensen P. M. & C. Ulloa Ulloa	1994
Ecuador	Pichincha	Jørgensen P. M. & S. León-Yáñez	1999
Ecuador	Sucumbíos	Todzia C. A.	1990
Ecuador	Sucumbíos	Jørgensen P. M. & S. León-Yáñez	1999

Fuente. Jørgensen & León-Yáñez (Eds.) (1999)

En la provincia de Chimborazo-Ecuador, donde se encuentra ubicado el bosque de Jacarón, existen dos reportes: J. Clark, con el espécimen 1278 en el año 1995 y del botánico J. Caranqui, con el espécimen 1391, correspondiente a *Hedyosmum luteynii* Todzia, en el año 2005; y que al momento de realizar ésta investigación aún no se encuentran reflejados en la base de datos del catálogo de plantas vasculares del Ecuador (siguiente Figura) (De La Torre et al., 2006; Guerrini et al., 2016; Jørgensen & León-Yáñez (Eds.), 1999; Todzia, 1988).

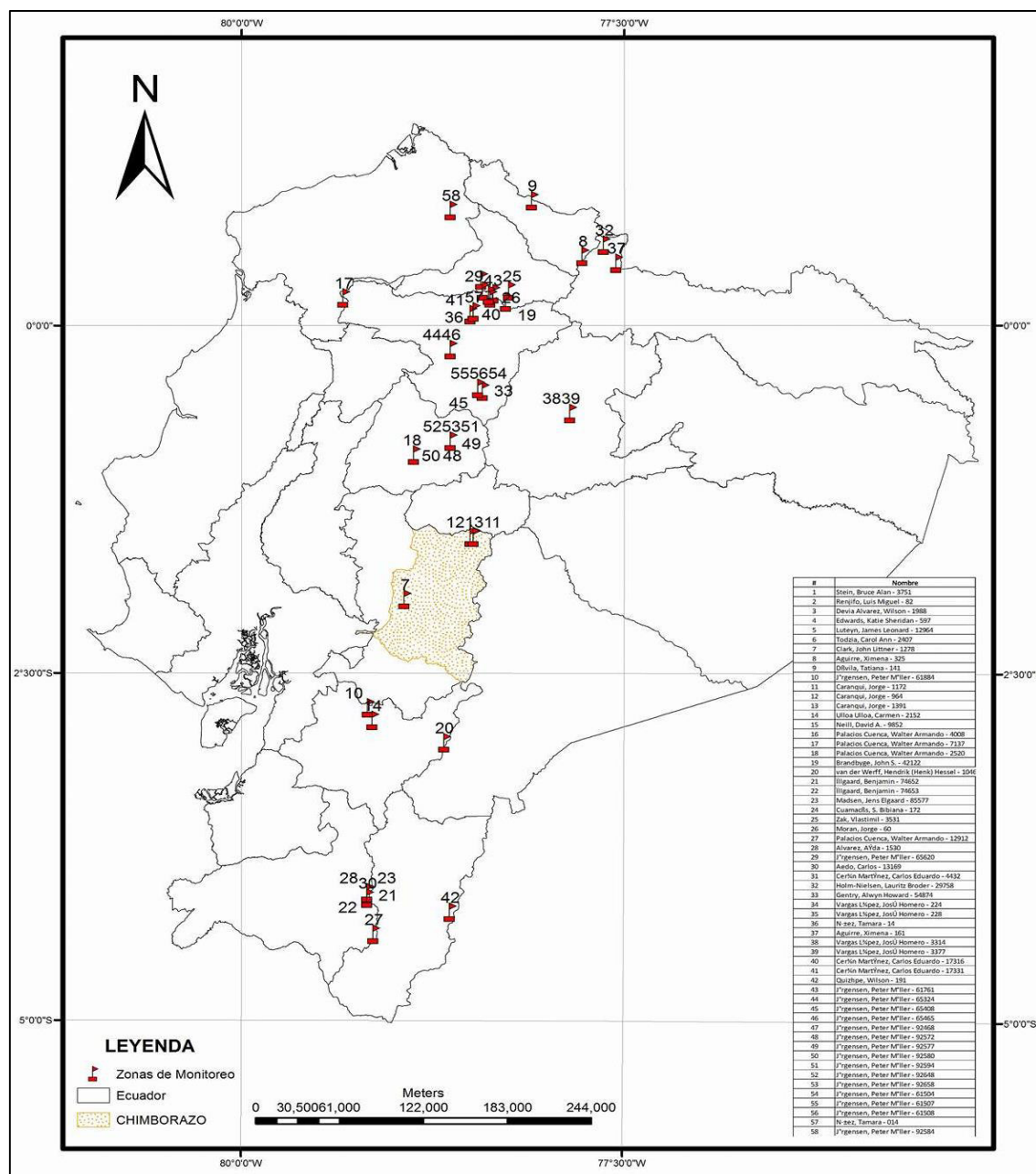


Figura 2: Distribución del género *Hedyosmum* en el Ecuador. Fuente: (Torres et al., 2018).

Los sectores donde se identificaron especies del género *Hedyosmum* en Ecuador, se reportan en el sector de Pallatanga, en la zona alta de transición, aledaña al bosque Jacarón; mientras que el segundo reporte está ubicado en el sector de Penipe en la zona alta del bosque de ceja andina.

2.3.2. Inventario forestal del bosque de Jacarón, Columbe, Chimborazo, Ecuador

Cuadro 3: Abundancia de especies vegetales en el Bosque de “Jacarón”

Nombre científico	# Individuos	% Abundancia
<i>Buddleja incana</i>	4	5,97
<i>Clusia flaviflora</i>	4	5,97
<i>Gynoxys halli</i>	7	10,45
<i>Hedyosmum luteynii</i>	22	32,84
<i>Hesperomeles ferruginea</i>	2	2,99
<i>Myrsine andina</i>	6	8,96
<i>Oreopanax aequadorensis</i>	6	8,96
<i>Polylepis reticulata</i>	3	4,48
<i>Vallea stipularis</i>	5	7,46
<i>Aegiphylla ferruginea</i>	3	4,48
<i>Miconia crocea</i>	5	7,46

Fuente. Torres et al., 2018

En la evaluación del inventario forestal realizado en el bosque de Jacarón, se lograron identificar 11 especies vegetales, en los tres rangos altitudinales pre-establecidos; siendo las especies más abundantes, *Hedyosmum luteynii* Todzia, con un promedio en las tres parcelas de 32,84 %, con 22 individuos, mientras que *Hesperomeles ferruginea*, mostró 2 individuos que poseen el menor valor registrado 2,99 %; las demás especies tienen una distribución similar en los tres puntos de monitoreo.

Para el análisis de la densidad relativa (DR) se consideró la frecuencia de las especies en el total de puntos de monitoreo; mientras que el valor de importancia (VI) evalúa la abundancia y la frecuencia relativa (Cascante y Estrada, 2001).

Cuadro 4: Valor de importancia de la especie *Hedyosmum luteynii* Todzia, en el Bosque de “Jacarón”

Especie	DR	VI especie
<i>Buddleja incana</i>	5,97	9,24
<i>Clusia flaviflora</i>	5,97	9,24
<i>Gynoxys halli</i>	10,45	11,47
<i>Hedyosmum luteynii</i>	32,84	22,67
<i>Hesperomeles ferruginea</i>	2,99	4,62
<i>Myrsine andina</i>	8,96	10,73
<i>Oreopanax aequadorensis</i>	8,96	7,60
<i>Polylepis reticulata</i>	4,48	5,36
<i>Vallea stipularis</i>	7,46	6,86
<i>Aegiphylla ferruginea</i>	4,48	5,36
<i>Miconia crocea</i>	7,46	6,86

Fuente. Torres et al., 2018

A través de este estudio se determinó que el valor de importancia de la especie *Hedyosmum luteynii*, es de 22,67%, mientras que valores inferiores a 5,36% se establecieron para las especies de *Polylepis reticulata* y *Aegiphylla ferruginea*. Estos resultados muestran la amplia distribución de las especies, en los diferentes pisos altitudinales y que se ve reflejada también en los diferentes puntos de monitoreo (Torres et al., 2018).

2.3.3. Características morfológicas de la especie *Hedyosmum luteynii* Todzia

Hedyosmum luteynii, es una especie dioica de tronco cilíndrico, copa angosta, corteza exterior café claro a gris y de aspecto fisurado, madera blanca blanda (Herrera, Morocho, Vidari, Bicchi & Gilardoni, 2018). Las ramas cortadas

segregan un mucilago; las hojas opuestas, aromáticas, simples elípticas u oblongo lanceoladas de 4 a 12 cm de largo y de 2 a 8 cm ancho, ligeramente escabrosas en el haz, márgenes aserrados a serrulados, ápice acuminado, haz verde lustroso y envés verde pálido áspero y pubescente, nervaduras central canaliculada y nervación craspedódroma, 18 a 22 pares de nervios secundarios, peciolo púrpura; inflorescencia masculina con espigas de 2 a 3 pares opuestos en ejes cortos de 1 a 3 cm; frutos elipsoidales en címulas blancas cubiertos de brácteas globosas de 1 a 1,5 cm de diámetro, color violeta a negro (Herrera et al., 2018).

Cuadro 5: Características morfológicas *Hedyosmum lutey nii* Todzia

Características Morfológicas	Registro Fotográfico
<ul style="list-style-type: none"> • Coloración característica de la etapa de fustal inicial. • DAP comprendido entre 25 cm. • Borde tipo aserrado no agudo. • Color verde intenso en el haz; verde más obscurecido en el envés. 	 <p data-bbox="922 1368 1182 1413">Etapa fustal inicial</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Presenta una alta tasa de regeneración. • Se presenta en asociación con otras especies. • No presenta daños mayores a causa de problemas fitosanitarios. 	 <p data-bbox="890 1794 1219 1839">Etapa de regeneración</p>

-
- Rebrotos secundarios abundantes, que denotan la presencia de altas concentraciones de AIB (ácido indolbutírico), ANA (ácido naftalenacético) y AIA (ácido indolacético).



Etapa de regeneración

Fuente. Torres et al., 2018

La identificación botánica de *Hedyosmum luteynii* Todzia, se basa en el tipo de hoja, la estructura del esclerénquima, que es el tejido de sostén de algunas plantas formado por células muertas a la madurez, cuyas paredes secundarias están engrosadas y endurecidas; existe estrecha relación de las especies *Hedyosmum cuatrecazanum*, *Hedyosmum maximun* y *Hedyosmum luteynii*, que comparten el tipo de esclerénquima dentado en los bordes (Todzia, 1988).

2.3.4. Metabolismo secundario de las plantas

En las especies vegetales se encuentran los llamados metabolitos secundarios que se presentan generalmente con estructuras químicas complejas. Estos compuestos están distribuidos en los distintos órganos de la planta en mayor o menor concentración, su presencia depende de la etapa de crecimiento en la que se encuentre y de los factores externos a los que esté sometida, los cuales activan la funcionalidad de los mismos (Pomilio, 2012).

Se conoce que los metabolitos secundarios se desarrollan en las plantas como producto o respuesta a un estímulo externo del que la especie pretende defenderse o responder ante efectos como la polinización, radiación UV, repeler

insectos, microorganismos, procesos de germinación entre los principales (Pomilio, 2012).

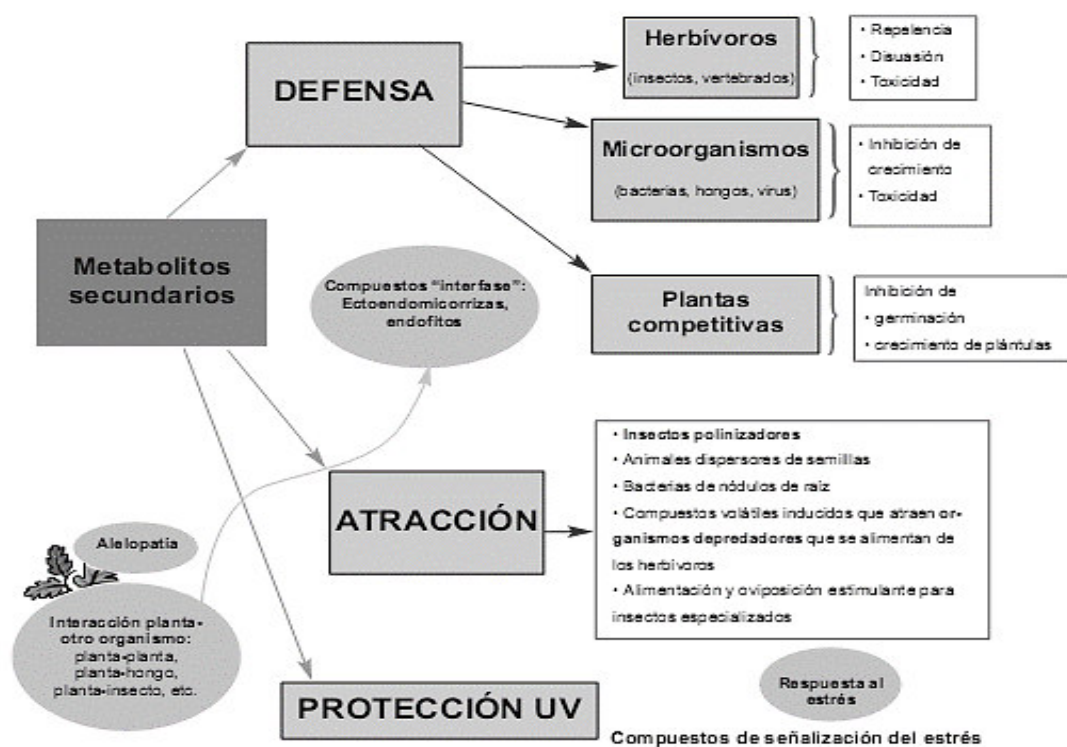


Figura 3: Los metabolitos secundarios y su función en las plantas. Fuente: Pomilio (2012).

Una planta considerada como ser vivo necesita y utiliza sustancias como energía que toma de su entorno para su crecimiento y desarrollo, ya que a partir de ellas sintetiza sus componentes celulares necesarios (Pomilio, 2012). Del mismo modo todo sistema biológico, tiene en su hábitat natural enemigos potenciales y reales que impiden su crecimiento y desarrollo e inclusive provocan su muerte. Estos enemigos pueden ser bacterias, hongos, insectos, ácaros, nemátodos, mamíferos y otros animales herbívoros (Pomilio, 2012).

Para protegerse de los enemigos naturales y del entorno, las plantas sintetizan a partir de metabolitos primarios, compuestos generalmente tóxicos, denominados metabolitos secundarios (Pomilio, 2012). Las vías metabólicas a través de las cuales estos se sintetizan y degradan se constituyen como el metabolismo secundario de las plantas (Pomilio, 2012).

2.3.5. Función ecológica y fisiológica de los metabolitos secundarios

La importancia de la función ecológica de los llamados metabolitos secundarios se ha puesto de manifiesto a partir de investigaciones realizadas que datan de la década de los 60, atribuyéndoles como función principal la de ser un mecanismo de protección contra infecciones provocadas por microbios y la acción contra los herbívoros (Pomilio, 2012).

Se atribuyeron además a los compuestos secundarios, la función de servir para atraer polinizadores y dispersores de frutos y semillas, así como la de actuar como agentes de competencia entre plantas (Pomilio, 2012).

2.3.6. Principales metabolitos secundarios

Tomando como base las vías del metabolismo primario a partir de las cuales se sintetizan los metabolitos secundarios se dividen en tres grandes grupos: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos conteniendo nitrógeno (Pomilio, 2012).

2.3.7. Principios activos de las plantas

Los metabolitos secundarios son los considerados principios activos que encontrándose como producto del metabolismo de las plantas para su beneficio, pueden ser empleadas para curar, aliviar e incluso prevenir enfermedades de organismos superiores como los humanos. (Berdonces, 1995). Se considera a una especie vegetal como terapéutica o medicinal si se ha observado alguna acción positiva sobre los individuos que lo han utilizado (Berdonces, 1995). Las estructuras de los metabolitos secundarios de las plantas son complejas y difíciles de elucidarlas porque generalmente se encuentran en mezclas de varias sustancias, a pesar de esto muchos de ellos han sido extraídos, aislados, purificados y establecida su estructura química, llegando incluso a ser sintetizados para uso orgánico (Berdonces, 1995).

Posibles respuestas para explicar por qué las plantas producen los principios activos: Los procesos de fotosíntesis desarrollados por los vegetales sirven para elaborar productos necesarios para su supervivencia, estos compuestos son de estructuras variadas dependiendo de su función a desempeñar, siendo los principales las proteínas, carbohidratos, ácidos grasos, vitaminas y minerales (Miño, 2007).

Se creería que con las sustancias descritas en el párrafo anterior las plantas tendrían lo suficiente para su desarrollo normal, pero se ha observado que generan ciertos compuestos llamados metabolitos secundarios que le servirían para responder ante estímulos externos, como mecanismos de defensa, protección y otros (Miño, 2007).

Postulado religioso: asevera que “Dios creó los vegetales para la alimentación de los hombres y el tratamiento de enfermedades que lo afectan”, la religión indica que el hombre debería encontrar en la naturaleza prodigada por Dios Todopoderoso todos los elementos necesarios para su alimentación y en especial para curar sus enfermedades y dolencias, siendo Dios el creador y

proveedor de todas estas sustancias a través de las plantas existentes (Cornejo, Cantón y Llera, 2008).

Postulado metabólico: propone que los seres humanos a diferencia de los vegetales cuentan con sistemas de eliminación de desechos y toxinas que son eliminados para su adecuado funcionamiento, mientras que las plantas resultado de su metabolismo producen ciertas sustancias de naturaleza compleja, en algunas ocasiones tóxicas pero que se ha observado que pueden ser efectivas para curar enfermedades de los seres humanos (Cornejo, Cantón y Llera, 2008).

Postulado de la adaptación: se deriva de los enunciados emitidos por el padre de las teorías evolucionistas Charles Darwin, quien menciona que las plantas por la adaptación al ambiente en donde se desarrollan producen ciertas sustancias o metabolitos que le permiten su supervivencia en el medio o lugar en que viven (Cornejo, Cantón y Llera, 2008).

La Fitoquímica es una ciencia que tiene como propósito el aislamiento, análisis, purificación, determinación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de las sustancias producidas por las plantas (Vidaurre, 2006).

2.3.8. Familia Chloranthaceae.

La Familia Chloranthaceae, es una familia perteneciente a las angiospermas del orden de las Chloranthales (Moraes, Øllgaard, Kvist, Borchsenius & Balslev (Eds.), 2006). Esta familia consta de cuatro géneros con 80 especies vegetales, que se encuentran distribuidas en múltiples lugares como en Asia, en un amplio sector de las islas del Pacífico, América Central y América del Sur (Moraes et al., 2006).

Generalmente esta especie vegetal se presenta como árboles, algunos de ellos de gran tamaño, también pueden ser arbustos o hierbas, que se caracterizan por su fuerte aroma que denota la presencia de aceites esenciales. Presentan hojas

perennes, conduplicadas, pinnatinervias, simples, secundariamente broquidódromas a eucamptódromas o semicraspedódromas, dentadas, decusadas, glabras o con tricomas glandulares, uni-a multiseriados, con peciolo más o menos soldados a la base, que forma una vaina diferenciada a lo largo del tallo, estípulas, interpecioloares, cercanas a la vaina (Moraes et al., 2006).

2.3.8.1. Género *Hedyosmum*.

El género *Hedyosmum*, consta de 44 especies, encontradas principalmente en las montañas de México hasta Brasil y Paraguay; además se ha reportado una especie en el sureste de Asia (Giraldo, 2001).

En el Ecuador están reportadas unas 15 especies; 12 se encuentran en los bosques andinos y subpáramos: *Hedyosmum anisodorum* Todzia, *Hedyosmum cuatrecazanum* Occh., *Hedyosmum cumbalense* Karsten, *Hedyosmum goudotianum* Solms-Laub., *Hedyosmum luteynii* Todzia, *Hedyosmum racemosum* G. Don, *Hedyosmum luteynii* (Herrera et al, 2008) Solms-Laub., *Hedyosmum purpurascens* Todzia, *Hedyosmum spectabile* Todzia, *Hedyosmum sprucei* Solms-Laub., *Hedyosmum strigosum* Todzia y *Hedyosmum translucidum* Cuatrec (Caranqui y Pino, 2016).

2.3.9. Evaluación biofísica del bosque de Jacarón

Las características de los suelos de los andes son variadas, debido a su formación existe una complejidad de propiedades que van formando microclimas y ambientes adecuados para que la vegetación se adapte a estas características (Rodríguez, Carrión, Santillán, Recalde, & Cargua, 2017). Los suelos son del orden INCEPTISOLES, suborden ANDEPS, con contenido alto de materia

orgánica, pH ligeramente ácido, densidad cercana a uno, características de color 10YR, perfiles profundos, capacidad alta de drenaje y de campo al 100%, estos suelos tienen características productivas muy altas, limosos con arena muy fina (FAO, 2009).

Cuadro 6: Matriz de evaluación del medio abiótico del bosque Jacarón

Sector	Variable	Descripción
Bosque Jacarón	Pendiente	Montañosos (>70) %, 104,9 ha; escarpada (50-70) %; superficie de 10,8 ha.
	Hidrología	La red hídrica de nivel 1 con el nombre de quebrada “el preñado”, aportante a la gran cuenca del río Guayas.
	Curvas de Nivel	Predomina el clima ecuatorial frío de alta montaña, de 3200-3480 msnm
	Orientación de la Cuenca	Este Oeste
	Aptitud del Suelo	Categorías de tipo de suelo VIII: Tierras aptas para la conservación de vida silvestre.
	Conflicto de Uso de suelo	Evidencia una área bien utilizada

Fuente. Torres et al., 2018

2.3.9.1. Evaluación biótica del bosque de Jacarón.

La evaluación del medio biótico es la base fundamental al momento de establecer medidas de conservación en áreas intervenidas, la reconversión de la tierra es importante debido a que los cambios en la cobertura deben ser evaluados considerando la aptitud, la vegetación predominante y las características del medio abiótico (Torres et al., 2018).

Cuadro 7: **Matriz de evaluación del medio biótico del bosque Jacarón**

Sector	Variable	Descripción
Bosque Jacarón	Ecosistemas	Bosque siempreverde montano alto de la cordillera occidental de los Andes
	Usos de Suelo	Vegetación arbórea (especies forestales y arbustivas), Herbazal de páramo (páramo de pajonal), e intervención (pastos cultivados y naturales).

Fuente. Torres et al., 2018

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1. Área de estudio

Geográficamente el área de estudio de donde se obtuvieron las muestras (hojas) de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se encuentra situada en el bosque de Jacarón, perteneciente a la parroquia Juan de Velasco, cantón Colta, provincia de Chimborazo-Ecuador.

El bosque posee una área de 114,90 ha. y se localiza entre las coordenadas UTM: 734728 Este y 9787438 Norte; dentro de un rango altitudinal de 3200 - 3500 m.s.n.m., a una distancia de 82 km al sur de la provincia de Chimborazo (siguiente Figura) (Burbano, 2017).

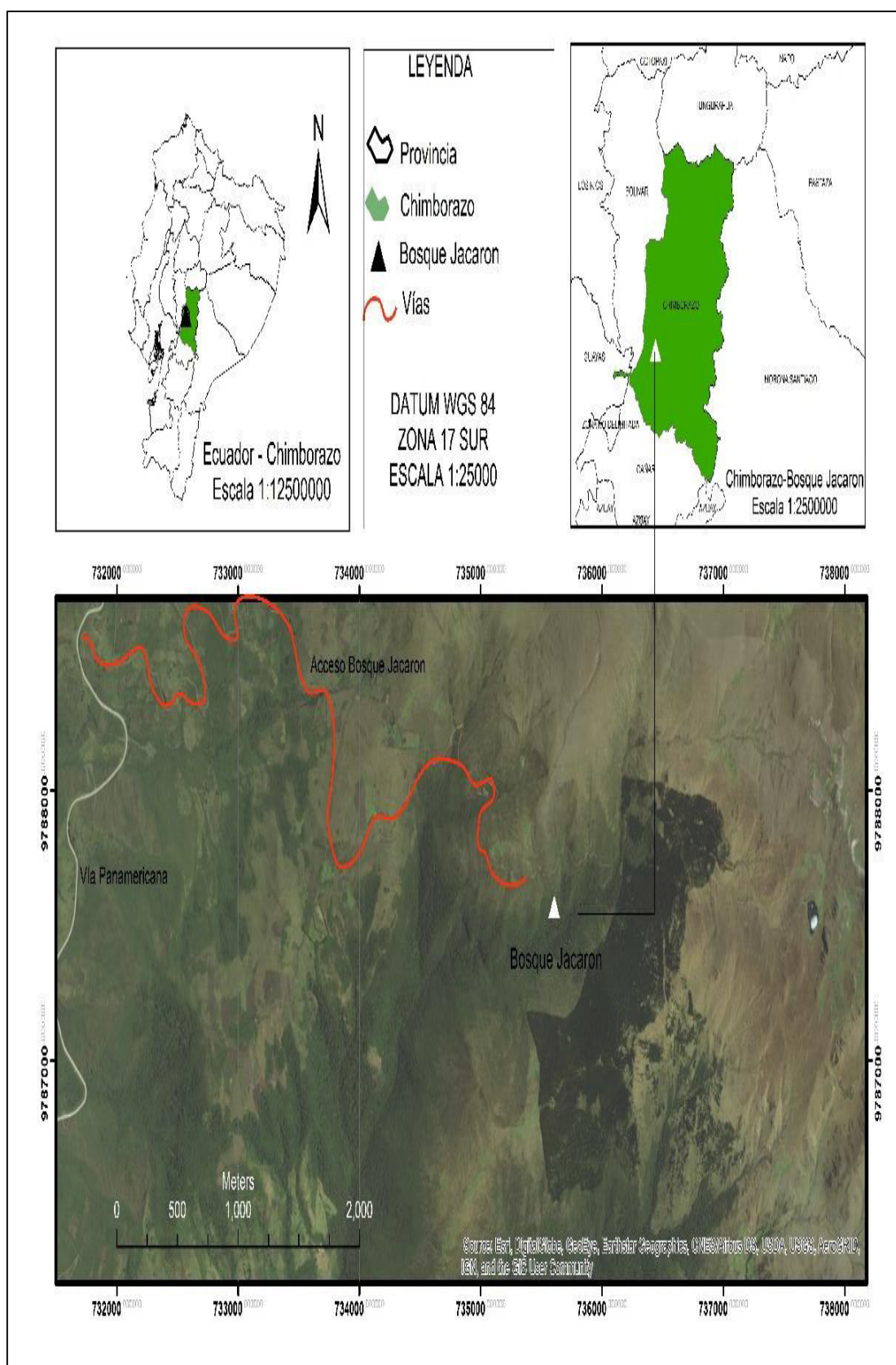


Figura 4: Ubicación del bosque de Jacarón. Fuente: Torres et al., 2018

La obtención de los extractos como de los aceites esenciales, los análisis físicos, químicos, bromatológicos, fitoquímicos, microbiológicos y de la composición química de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se desarrolló en los laboratorios de “Servicios Ambientales” de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Chimborazo, Riobamba, Ecuador, el cual se encuentra acreditado por el Organismo de Acreditación Ecuatoriana, con certificado No. OAE - LEC-12-006 y en el “Laboratorio de Microbiología” de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Nacional de Chimborazo, Riobamba-Ecuador.

3.2. Materiales y métodos para el muestreo y recolección del material vegetal de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

3.2.1. Materiales para la recolección del material vegetal de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Cuadro 8: Materiales utilizados para la recolección del material vegetal de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Materiales	Recolección de muestras
Tijeras de podar	Herramienta de corte marca Bellota, utilizada para recolección de muestras biológicas (hojas, ramas etc.).
Fundas herméticas ziploc	Para transporte y preservación del material vegetal.
Prensa	Herramienta utilizada para herborizar muestras botánicas.
Libreta para campo	Herramienta usada para hacer anotaciones cuando se ejecutan trabajos de campo.

GPS (Trimble Juno SB)	Para determinar la posición de un objeto con mucha precisión.
Brújula (360°)	Sirve para determinar cualquier dirección de la superficie terrestre por medio de una aguja imantada que siempre marca los polos magnéticos Norte-Sur.
Hipsómetro (SUNNTO)	Para medir ángulos verticales (pendientes o inclinaciones) y alturas de los objetos analizados (árboles).
Guía dendrológica	Para identificar y caracterizar especies vegetales de bosque andino.
Mapas de ubicación	Representación gráfica simplificada de la zona de estudio (Orientación).

Fuente. Torres et al., 2018

3.2.2. Métodos para la selección del material vegetal de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Mediante el inventario forestal del bosque de Jacarón, se establecieron 3 parcelas que corresponden al 10 % de las estudiadas en el trabajo de investigación elaborado por (Burbano et al., 2014), para la evaluación dasométrica se establecieron parcelas circulares de 500 m² (FAO, 2004).

La selección del material vegetativo, se realizó utilizando las claves taxonómicas que sirven para determinar con exactitud el tipo de especie motivo de estudio, un factor a considerar es su morfología, estado fenológico adecuado en el cual contenga su máximo potencial de fotosíntesis (Bernal et al., 2011).

Para la presente investigación se seleccionaron al azar 30 plantas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) ubicadas en las parcelas del bosque de Jacarón, perteneciente a la parroquia Juan de Velasco, cantón Colta, provincia de Chimborazo-Ecuador. El espécimen fue identificado y descrito por el MSc. Xavier Cornejo, curador del Herbario Guay de la Universidad de Guayaquil, Ecuador, bajo el código 0056.

De las plantas seleccionadas se trabajó con las hojas, debido a que son las partes del vegetal que son utilizadas en infusión medicinal por los habitantes de la zona y porque botánicamente son consideradas los principales órganos donde se generan todos los procesos fotosintéticos, lo que fue comprobado con los resultados del análisis proximal o bromatológico realizado en las hojas maduras, desarrolladas y jóvenes de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia). Mediante un diseño de experimentos 3², se evidenció que los mejores resultados están las hojas desarrolladas, lo que corrobora las versiones de los moradores del sector, quienes manifestaron la utilización de las hojas desarrolladas de esta especie en infusión para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y respiratorias.

La recolección del material vegetal (hojas frescas desarrolladas) de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se lo realizó empleando metodologías de corte, recolección, monitoreo y evaluación, con la finalidad de que no se cause un gran impacto debido a la intervención antrópica de esta zona (Giraldo, 2001).

Cuadro 9: Ficha de recolección de muestra vegetal de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Recolector: Silvia Torres	Fecha: octubre 17-2017
Nombre científico: <i>Hedyosmum luteynii</i>	Nombre común: Tarqui, borracho
País: Ecuador	Provincia: Chimborazo
Cantón: Colta	Parroquia: Juan de Velasco
Sector: Jacarón	Coordenadas: 1,92°S 78,80° W
Altitud: 3280 m.s.n.m.	Forma de vida: árbol

Fuente. Torres et al., 2018

Para llevar a cabo este proceso se establecieron tres técnicas metodológicas (siguiente Figura), con el fin de lograr recopilar la mayor información sobre la

especie de interés. La primera enmarcada en el establecimiento de medidas de variación de la distribución florística y abundancia; la segunda hace referencia a los criterios de evaluación de inventarios sucesivos, que consiste en realizar un monitoreo en un tiempo determinado en el mismo bosque y repetirlo en un lapso de tiempo de un año (Orozco, L. y Brumér, C. (Eds.), 2002). Esto permite establecer los efectos de la intervención antrópica en el área de estudio (Orozco, L. y Brumér, C. (Eds.), 2002).

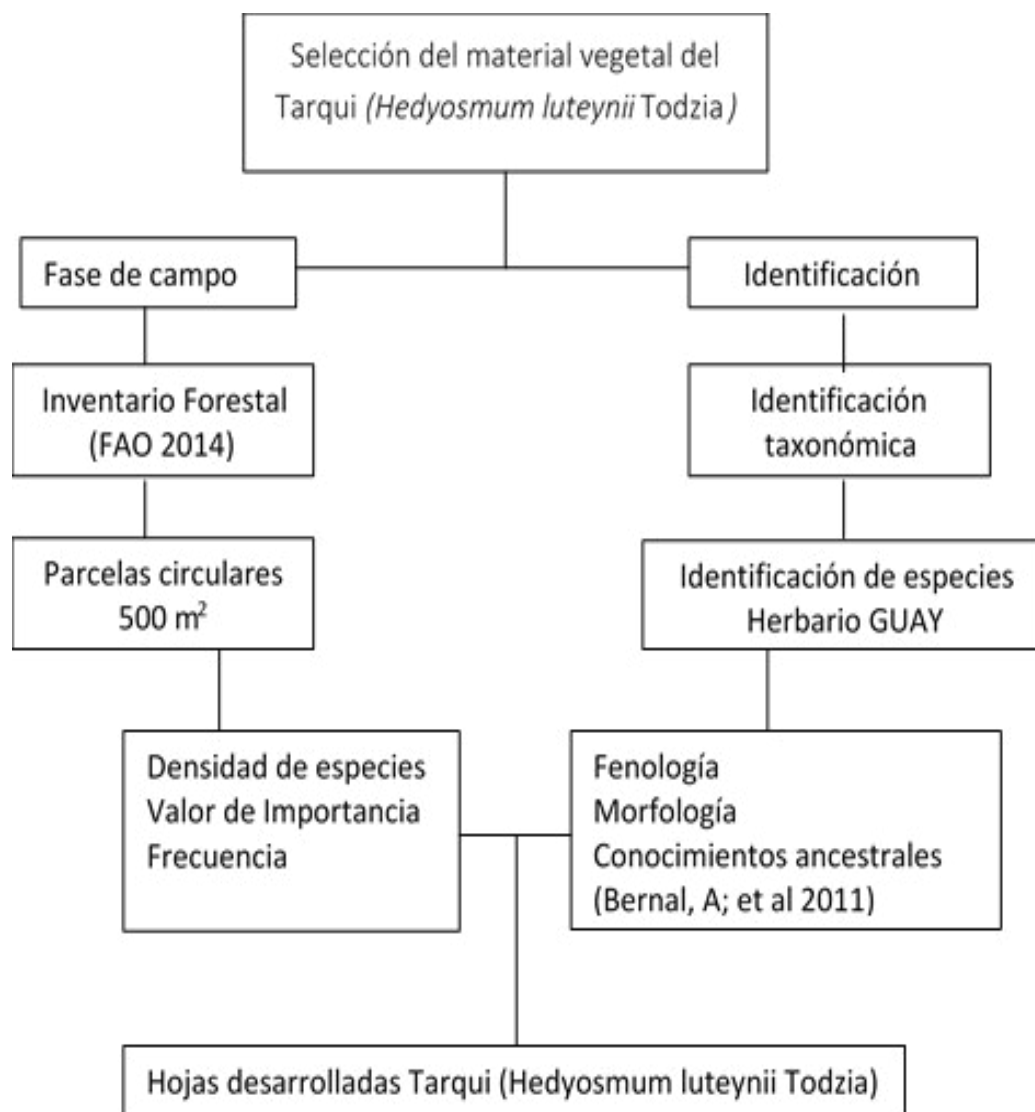


Figura 5: Diseño metodológico para el procesamiento del material vegetal de Tarqui. Fuente: (Torres et al., 2018)

3.2.2.1. Recolección de material vegetal.

Las hojas frescas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) fueron recolectadas de forma manual en los meses de julio y agosto, en el bosque natural del ecosistema Jacarón ubicado en la parroquia Juan de Velasco, cantón Colta, provincia de Chimborazo, Ecuador; coordenadas UTM: $x = 735000$ $y = 9787500$, zona 17S (Torres et al., 2018).

El bosque cubre una superficie de 114,90 ha, con un rango altitudinal de 3200-3500 msnm, temperatura de 9 a 12 °C y precipitación anual de 1200 mm (Torres et al., 2018).

Los suelos están formados por cenizas volcánicas, con altos contenidos de materia orgánica, valores de pH entre 5,5 y 6,5; taxonómicamente son clasificados a nivel de gran grupo como Dystrandepts en el orden de inceptisoles, en correspondencia con suelos jóvenes de poco desarrollo que presentan gran acumulación de materia orgánica y saturación de bases menor al 50% (Torres et al., 2018).

Las muestras recolectadas de hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) se colocaron en sacos de polietileno y fueron trasladadas hasta los laboratorios de Química de la Universidad Nacional de Chimborazo en la ciudad de Riobamba - Ecuador, en donde fueron conservadas en espacios adecuados limpios, secos y sin humedad.

Posteriormente del material recolectado de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se seleccionaron las hojas sanas, libres de flores y tallos que fueron lavadas con agua potable y desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 2%. Se las dispuso sobre pliegos de papel periódico para secado a temperatura ambiente antes de someterlas a los procesos de extracción y análisis correspondientes (bromatológico, fitoquímico, microbiológico, pruebas in vivo y otros).

3.2.2.2. Selección del material vegetativo viable de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), para el análisis fitoquímico que permita determinar los principios activos.

La infusión de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), ha sido utilizada como medicinal de manera tradicional por los indígenas de la parroquia Juan de Velasco, cantón Colta, provincia de Chimborazo, Ecuador.

La muestra testigo de Tarqui (siguiente Figura), una vez que su identificación taxonómica fue confirmada como *Hedyosmum luteynii* Todzia, por el MSc. Xavier Cornejo, curador asociado del Herbario GUAY, fue depositada en el Herbario de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil, Ecuador bajo el código 0056. Esta especie es la que se utilizó para realizar el análisis fitoquímico que permitió determinar los principios activos y su uso potencial en la medicina.



Figura 6: Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia). Fuente: (Universidad de Guayaquil, 2017)

3.3. Materiales y métodos para el análisis fitoquímico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

3.3.1. Materiales para para el análisis fitoquímico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Cuadro 10: Materiales utilizados para el análisis fitoquímico del Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	
Materiales	Procedimiento
Pinzas	Para sujetar diferentes objetos de vidrio (embudos de laboratorio, buretas).
Tijeras	Para cortar estructuras blandas en diferentes tamaños.
Tamiz	Para separar mezclas o hacer pasar partículas sólidas de diferentes tamaños.
OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE TARQUI	
Materiales	Procedimiento
Frascos de vidrio	Para macerar las muestras del material vegetal de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).
Papel filtro Wattman N° 20	Para filtrar las soluciones del extracto del material vegetativo de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).
Embudo	Para trasvasar líquidos y materiales granulares.
Corchos	Para tapar frascos y evitar contaminación frente a condiciones climáticas externas.
Vasos de precipitación	Para preparar o calentar sustancias, medir o traspasar líquidos.

Frascos ámbar para evaporar	Para guarda la solución del material vegetal de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia) y evitar la descomposición por efecto de la luz.
Mangueras	Para traspasar líquidos o gases de un recipiente a otro.
Tapones de caucho	Para sellar un frasco mezclar el contenido, o guardarlo y prevenir pérdidas y contaminaciones.
Balones de fondo plano marca PYREX de 500 y 1000 ml	Para el calentamiento uniforme de distintas sustancias.
Soporte universal	Para sostener tubos de ensayo, buretas, embudos de filtración, criba de decantación o embudos de decantación, etc.

ANÁLISIS FITOQUÍMICO

Material	Procedimiento
Probetas	Para medir volúmenes de forma aproximada.
Pipetas	Para medir la alícuota de un líquido con mucha precisión o transferir una cantidad de un recipiente a otro.
Placa cromatográfica	Se emplean placas cromatográficas de sílica gel.
Columna cromatográfica	Se emplea una cantidad uniforme de un adsorbente, depositado en un tubo o columna de vidrio, de diferente diámetro y tamaño.
Tubos de ensayo	Para almacenar temporalmente sustancias o muestras (sólidos o líquido).
Tubos pírex	Para contener pequeñas muestras líquidas o sólidas.

Fuente. Torres et al., 2018

3.3.2. Reactivos para el análisis fitoquímico del Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Cuadro 11: Reactivos utilizados para el análisis fitoquímico del Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Reactivos	Usos
Hexano 92 %	Solvente para extraer los principios activos del material vegetal de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).
Etanol 96%	Solvente para extraer los principios activos del material vegetal de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).
Éter Etílico 96 %	Solvente para extraer los principios activos del material vegetal de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).
Hipoclorito de sodio 2%	Para el lavado y desinfección del material vegetal de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).

Fuente. Torres et al., 2018

3.3.3. Equipos para el análisis fitoquímico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Cuadro 12: Equipos utilizados para el análisis fitoquímico del Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Análisis	Equipo	Procedimiento
Pesado de muestras	Balanza de precisión Sartorius	Instrumento destinado a determinar la masa de un cuerpo. Se

			caracteriza por su exactitud precisión y sensibilidad. Capacidad: 220 g. Precisión (≥ 0.001 g)
Destilación	Destilador		Equipo utilizado para destilación por arrastre con vapor. Se calentó a ebullición durante 5-6 horas y los volátiles se colectaron en la bureta del Clevenger
Trituración	Molino cuchillas	de	Para realizar un corte más eficaz de las muestras de material vegetal de Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).
Secado muestras	de Estufa MEMMERT SFE400		Para secado de las muestras a una temperatura estable de 40 °C, por un tiempo de 24 horas hasta obtener peso constante y evitando alteraciones de los principios activos.
Espectrofotometría	Espectrofotómetro de AA. Marca Thermo Scientific.		Para detectar y determinar cuantitativamente elementos químicos presentes aceite esencial del Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).
Cromatografía	Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5973 serie II		Para identificación de los componentes del aceite esencial del Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).
Extracto vegetal	Rotavapor Digital IKA TM RV 10		El Evaporador Rotativo presenta un nuevo baño de calentamiento universal, cristalería vertical, características de seguridad de última generación y conectividad digital. Capacidad: 3L Velocidad: de 20 a 280 rpm

		Rango de temperatura (métrico): 0 a 180°C
		Ángulo: 0 a 45°
		Pantalla: Digital
		Altura (métrico): 430mm
		Peso (métrico): 20kg
Identificación	Microscopio	Para identificar rápidamente objetos que son demasiado pequeños para ser observados a simple vista.
pH	pH Metro	Para determinar el pH.

Fuente. Torres et al., 2018

3.3.4. Métodos para el análisis fitoquímico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

El análisis fitoquímico de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), hace referencia a los métodos descritos por la Farmacopea. La Ley 25/90 del Medicamento define a la Real Farmacopea Española (RFE) como el código que deberá respetarse para asegurar la uniformidad de la naturaleza, calidad, composición y riqueza de las sustancias medicinales y excipientes (Antunes y Quirós, 2017).

Para la determinación de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), fueron considerados los conocimientos y costumbres ancestrales de los indígenas del sector en cuanto al uso de las plantas, en virtud de su conocimiento en el manejo y uso de las especies vegetales con el propósito de aprovechamiento de las propiedades medicinales de las mismas (Antunes y Quirós, 2017). Así, la infusión de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) es utilizada para prevenir y tratar afecciones respiratorias y gastrointestinales (Antunes y Quirós, 2017).

En base a este conocimiento sobre el uso de las plantas, el cual ha sido transmitido de generación en generación, se recolectaron al azar hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) en las parcelas seleccionadas de tres pisos altitudinales en el bosque de Jacarón (Antunes y Quirós, 2017). Del material vegetal recolectado se seleccionaron hojas sanas y sin impurezas, mismas que se limpiaron con agua potable corriente y posterior desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 2%, para posteriores análisis (Antunes y Quirós, 2017).

Para la obtención del extracto de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), una parte de las hojas desinfectadas fue secada a la sombra a temperatura ambiente durante 7 días, con volteos del material vegetal. Después de este tiempo, la muestra fue colocada en una estufa (MWN, Alemania), que cuenta con circulación de aire caliente, a una temperatura de 40 °C, para retirar humedad excesiva de la muestra (Antunes y Quirós, 2017). Posterior se realizó la tritución y pulverización, para lo que se utilizó un molino de cuchilla, hasta obtener un polvo seco de partículas medianas y gruesas, empleado para realizar los extractos para los diferentes análisis (Antunes y Quirós, 2017).

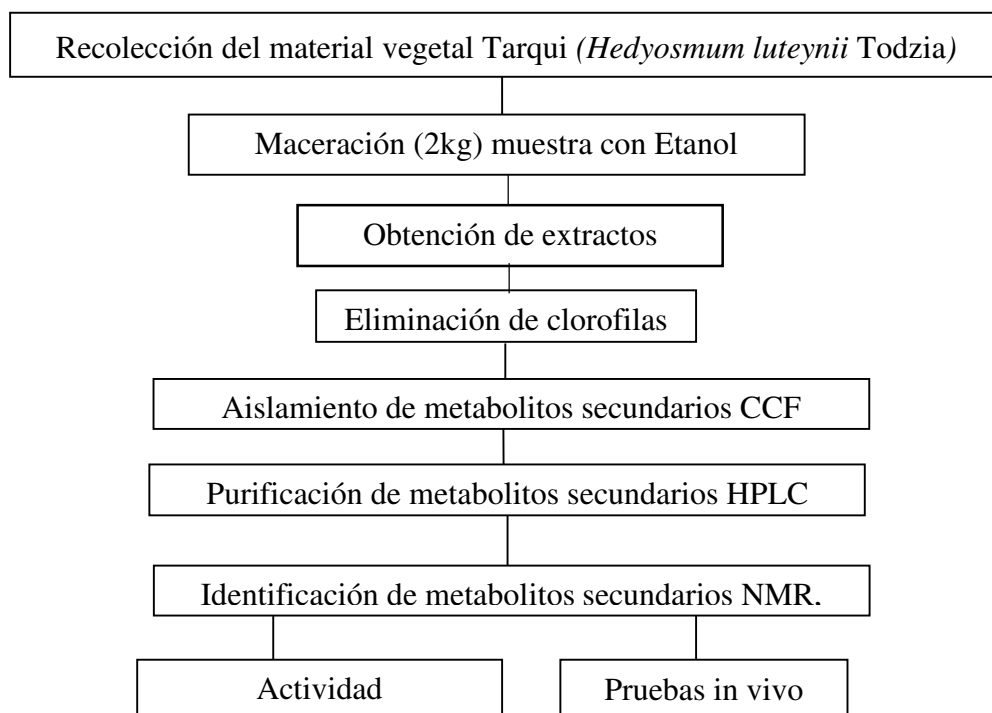


Figura 7: Esquema para el análisis fitoquímico de Tarqui. Fuente: (Torres et al., 2018)

3.3.4.1. Métodos de evaluación de las propiedades organolépticas de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

- a. Determinación del aspecto:** con una pipeta graduada se tomó una alícuota de extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se depositó en un tubo de ensayo y se observó directamente el aspecto que posee el extracto, pudiendo presentarse este como líquido, fluido, espeso, con precipitado u otro (Torres, Barbarú y Lema, 2016).
- b. Determinación del color:** se tomó 50 ml de extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) en un vaso de precipitación, se observó a contraluz y se anotó el color registrado (Torres et al., 2016).
- c. Determinación del sabor:** se tomó con una pipeta aproximadamente dos gotas de extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se probó

directamente con la lengua sin tragarlo y se registró el sabor percibido (Torres et al., 2016).

- d. Determinación del olor:** empleando una tira de papel filtro de 1 centímetro de ancho y unos 10 centímetros de largo, se la introduce en una solución etanólica de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se la retira y se percibe directamente con la nariz, se registra el olor detectado (Torres et al., 2016).

3.3.4.2. Métodos para el Análisis Proximal o Bromatológico de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

Se realizó el análisis proximal a las hojas de Tarqui (*Hedyosmum scabrum*), para lo que se emplearon las siguientes técnicas:

- Determinación de humedad A.O.A.C., 925.10, 1990 (Saavedra, 2016).
- Determinación de cenizas A.O.A.C., 923.03, 1990 (Saavedra, 2016).
- Determinación de proteína total (Kjeldahl) Método 2.057 A.O.A.C 1984 (Mera, 2015).
- Determinación de grasa o extracto etéreo, Método de Goldfish R. Lees. 1969 (Saavedra, 2016).
- Determinación de fibra cruda o bruta A.O.A.C 962.09, 2000 (Saavedra, 2016).

3.3.4.3. Tamizaje fitoquímico de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

El tamizaje fitoquímico comprende una serie de procedimientos físicos y químicos que ayudan a determinar cuali y cuantitativamente los principales grupos funcionales pertenecientes a los metabolitos secundarios presentes en las plantas y que se evidencian a través de la formación de precipitados,

reacciones de coloración entre otros. Las reacciones de identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios son específicas, lo que contribuye con la orientación adecuada hacia la identificación correcta de estos compuestos, son reacciones selectivas para las clases o grupos de compuestos que se investigan, detectan la mínima cantidad posible y utilizan un mínimo de equipo de laboratorio.

La obtención de los extractos de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) se realizó mediante el siguiente esquema:

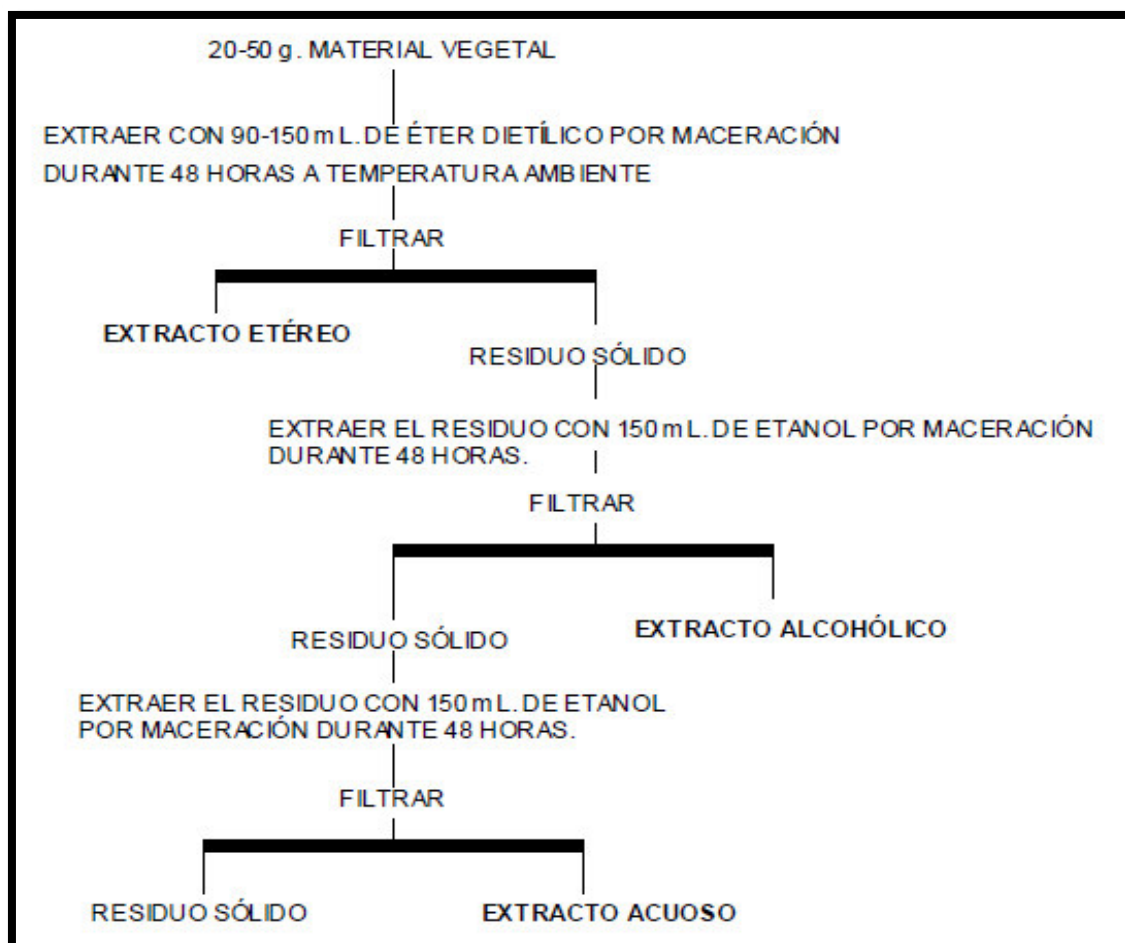


Figura 8: Esquema de obtención de extractos alcohólico, etéreo y acuoso de Tarqui. Fuente: (Torres et al., 2016).

- **Obtención del extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).**

Para la obtención del extracto etanólico, se pesaron 2 kg de muestra de hojas frescas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), en una balanza técnica (BS 2202S Sartorius, Alemania), utilizando como solvente etanol al 96%, en un volumen de 8 L; se licuó utilizando una licuadora doméstica marca Oster; el extracto obtenido se maceró por 72 horas, hasta agotamiento del material vegetal tratado (Torres et al., 2016). Transcurrido este tiempo se filtró, desechando el residuo vegetal y el extracto bruto etanólico se concentró a un volumen de 1 litro, se dejó reposar por un día en refrigeración a 8°C, para en lo posterior realizar los procedimientos y análisis físicos, químicos y microbiológicos determinado (Gómez y Tito, 2017).

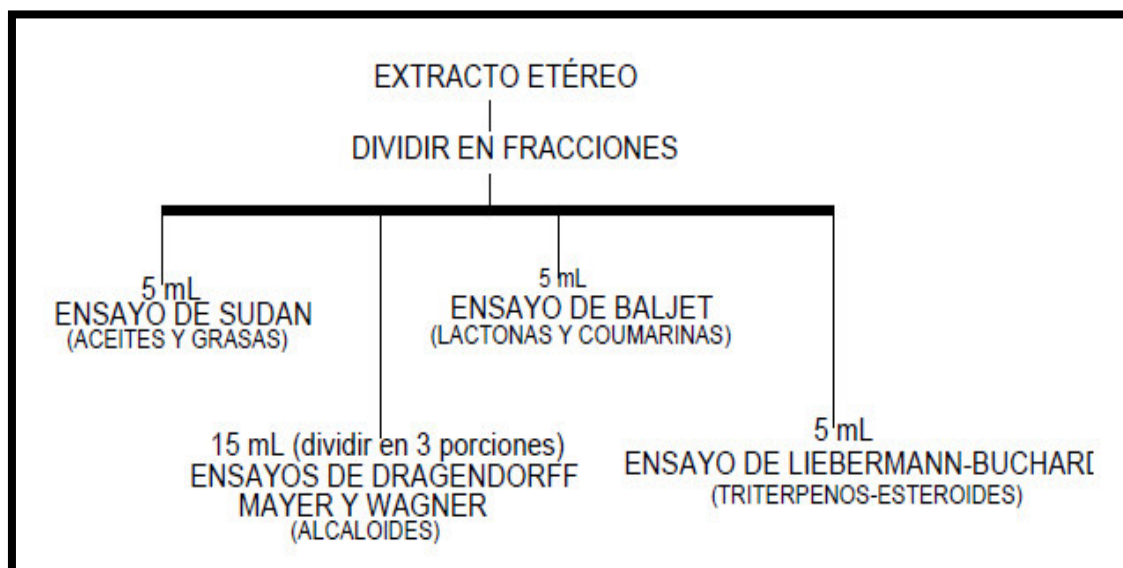


Figura 9: Esquema del análisis fitoquímico cualitativo en el extracto etéreo de Tarqui. Fuente: Gómez y Tito, 2017

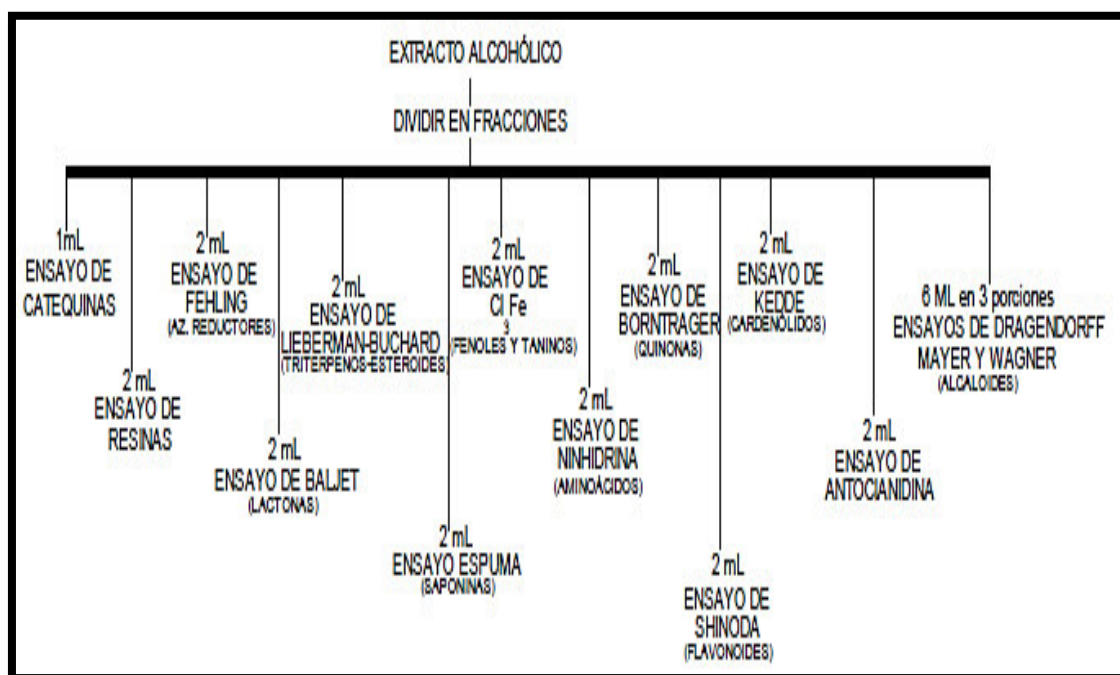


Figura 10: *Esquema del análisis fitoquímico cualitativo en el extracto alcohólico de Tarqui.* Fuente: Gómez y Tito, 2017

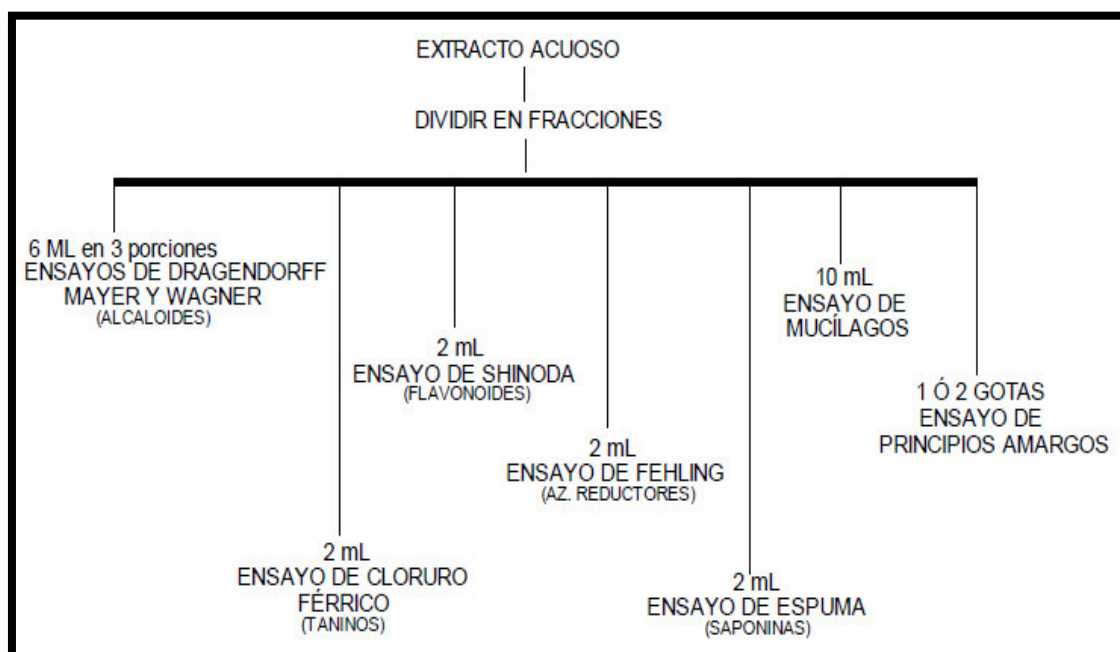


Figura 11: *Esquema del análisis fitoquímico cualitativo en el extracto acuoso de Tarqui.* Fuente: Gómez y Tito, 2017

Cuadro 13: Reacciones de caracterización para grupos fitoquímicos

GRUPOS FITOQUÍMICOS	PRUEBA	REACCIÓN POSITIVA
Compuestos Grasos	Ensayo de Sudan III o IV	Aparición de gotas o película coloreada de rojo, en el líquido o en las paredes del tubo
Alcaloides	Wagner	Opalescencia (+); Turbidez (++); precipitado marrón (+++)
	Mayer	Opalescencia (+); Turbidez (++); precipitado crema (+++)
	Dragendorff	Opalescencia (+); Turbidez (++); precipitado naranja (+++)
Lactonas y Cumarinas	Baljet	Coloración roja (++) o Precipitado rojo (+++)
Cumarinas	Hidroxamato férrico	Coloración violeta: Claro (++) , Intensa (+++) Por un cambio rápido de coloraciones que va:
Triterpenos y Esteroides	Lieberman-Burchard	Rosa- azul muy rápido Verde intenso- visible rápido Verde oscuro- negro final de la reacción
Azúcares Reductores	Fehling	Coloración o precipitado rojo Coloración rojo- vino (comp. Fenólicos en general)
Fenoles y Taninos	FeCl ₃	Coloración verde intensa (taninos del tipo pirocatecólicos) Coloración azul (taninos del tipo pirogalo tánicos)
	Shinoda	Coloraciones: amarillo, naranja, carmelita o rojo

Flavonoides	Ensayo de Antocianidinas	Coloración rojo- marrón
Saponinas	Ensayo de la espuma	Formación de espuma y su permanencia por 2 min. mínimo
Aminoácidos Libres	Ninhidrina	Coloración azul violáceo.
Glicósidos Cardiotónicos	Ensayo de Kedde	Coloración violácea
Quinonas	Borntrager	Coloración rosada (++) , roja (+++)
Polisacárido	Ensayo de Mucílagos	Consistencia gelatinosa
Glicósidos Cianogenéticos	Papel picrosodado	Coloración roja
Carotenoides	Carr-Price	Coloración verde-azulada

Fuente. Lock de Ugaz, 2016

a. Ensayo para saponinas.

Prueba de espuma: esta prueba sirve para determinar saponinas de tipo esteroideal como triterpénicas. El extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se diluyó en el doble de volumen de agua y se agitó fuertemente por el lapso de 5 a 10 minutos. La prueba se considera positiva si se genera espuma en la superficie del líquido de más de 2 cm de altura y persiste por más de dos minutos (Quispillo, 2013).

b. Ensayo para Fenoles.

Prueba de Cloruro Férrico: esta prueba permite determinar la presencia de grupos fenólicos y/o taninos en el extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), para lo que se tomó una alícuota del extracto etanólico de Tarqui, se le añadieron tres gotas de una solución de Tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0,9% en agua). Se consideran positivas las siguientes respuestas:

- Solución con coloración rojo-vino, indica presencia de compuestos fenólicos en general.
- Solución con coloración verde intensa, indica presencia de taninos pirocatecólicos.
- Solución con coloración azulada, indica presencia de taninos de tipo pirogalotánicos (Zaruma e Illescas, 2014).

Ensayo de Benedict: éste ensayo se fundamenta en la reacción en que, en un medio alcalino, el ion cúprico cedido por el sulfato cúprico, se reduce por efecto del grupo aldehído del azúcar a su forma de Cu^+ . Se considera positiva la reacción cuando hay presencia de un precipitado rojo ladrillo correspondiente al óxido cuproso (Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, 2017).

Ensayo para quinonas. Prueba Hidróxido de sodio (Borntrager): si la muestra analizada contiene otro solvente diferente de cloroformo, deberá ser evaporada a través de baño María, una vez evaporada la muestra se le añade 1 ml de cloroformo para reconstituirla. Se agregan 0,5 ml de hidróxido de sodio, de potasio o de amonio al 5%. Se coloca en un embudo de separación, donde se agita hasta su completa homogenización, para luego dejarla en reposo por el lapso de unos 10 minutos. El ensayo se considera positivo cuando la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado cuya proporción será mediana (xx) y si el color es rojo es positivo y la proporción será abundante (xxx) (Lock de Ugaz, 2016).

c. Ensayo para flavonoides.

Prueba de Ácido sulfúrico. - se presentan coloraciones para flavonas y flavonoles, de color amarillo fuerte; flavononas, anaranjadas o guindas; chalconas y auronas, rojo guinda o rojo azulado (Lock de Ugaz, 2016).

Ensayo de Shinoda. - Sirve para determinar presencia de flavonoides. Se toma una alícuota de extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) y se diluye con 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedazo de cinta de Magnesio metálico; se deja reaccionar por un lapso de 5 minutos, para luego añadir 1 ml de alcohol amílico, se mezcla y se deja reposar hasta que se observe separación de las fases. La prueba se considera positiva cuando el alcohol amílico se torna de un color amarillento, naranja o en algunos casos rojo intenso (Lock de Ugaz, 2016).

d. Ensayo para alcaloides.

Ensayo de Dragendorff.- se utiliza el reactivo que contiene nitrato de bismuto en ácido nítrico-yoduro de potasio, preparado en agua destilada. Se considera positiva la reacción para alcaloides cuando se observa un precipitado naranja o pardo anaranjado (Lock de Ugaz, 2016).

Ensayo de Wagner: esta prueba se trata de utilizar una solución ácida a la que se le agrega unas 2 o 3 gotas de reactivo de Wagner, a la que se le determina que existe reacción positiva si hay presencia de un precipitado marrón (Lock de Ugaz, 2016).

e. Ensayo para terpenos.

Ensayo de Rosenthaler.- esta prueba sirve la determinar en los extractos etanólicos la presencia de terpenos, para lo que se toma una alícuota de extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se le agrega una 3 gotas de reactivo de Rosenthaler, que consiste en una solución de vainillina al 1% en etanol y 1 ml de ácido clorhídrico concentrado. La solución será calentada y se pueden obtener como resultados positivos varios colores dependiendo del compuesto encontrado sea sapogenina esteroideal y triterpenoidales (Lock de Ugaz, 2016).

Para monoterpenos.- Sudan III: ésta prueba permite determinar la presencia de compuestos grasos, para lo que se toma una alícuota del extracto estudiado a la que se le agrega una solución acuosa diluida de reactivo de Sudan II o Sudan IV (1 mL), se evapora el solvente por medio de baño María. Se considera la reacción positiva para la presencia de ácidos grasos con la formación de gotas o una película de color rojo (Lock de Ugaz, 2016).

- ***Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios del extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).***
- **Preparación de los subextractos:** para la obtención de los subextractos de Tarqui se emplearon solventes de diferente grado de polaridad como el etanol, tolueno, acetato de etilo, cloroformo y butanol, para lo que se tomaron 50 ml de extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), a los que se añadieron tolueno más acetato de etilo en proporción 9:1, formándose dos fases que son separadas. Del mismo modo se procede con la muestra etanólica de Tarqui a la que se le añade cloroformo

con continua agitación, luego en reposo hasta obtener dos fases que deben ser separadas. Para el subextracto butanólico se tomaron 50 ml de extracto etanólico de Tarqui y se le añadió 2-butanol, formándose dos fases que son separadas para posterior tratamiento.

Las fases separadas en cada tratamiento son concentradas en rotoevaporadores, donde se elimina los solventes, controlando que la temperatura no sea mayor a 50 °C, lo que permite conservar los compuestos presentes en cada uno de los subextractos.

La metodología utilizada para la determinación de los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal, fue la propuesta por la Dra. Olga Lock de Ugaz (2013).

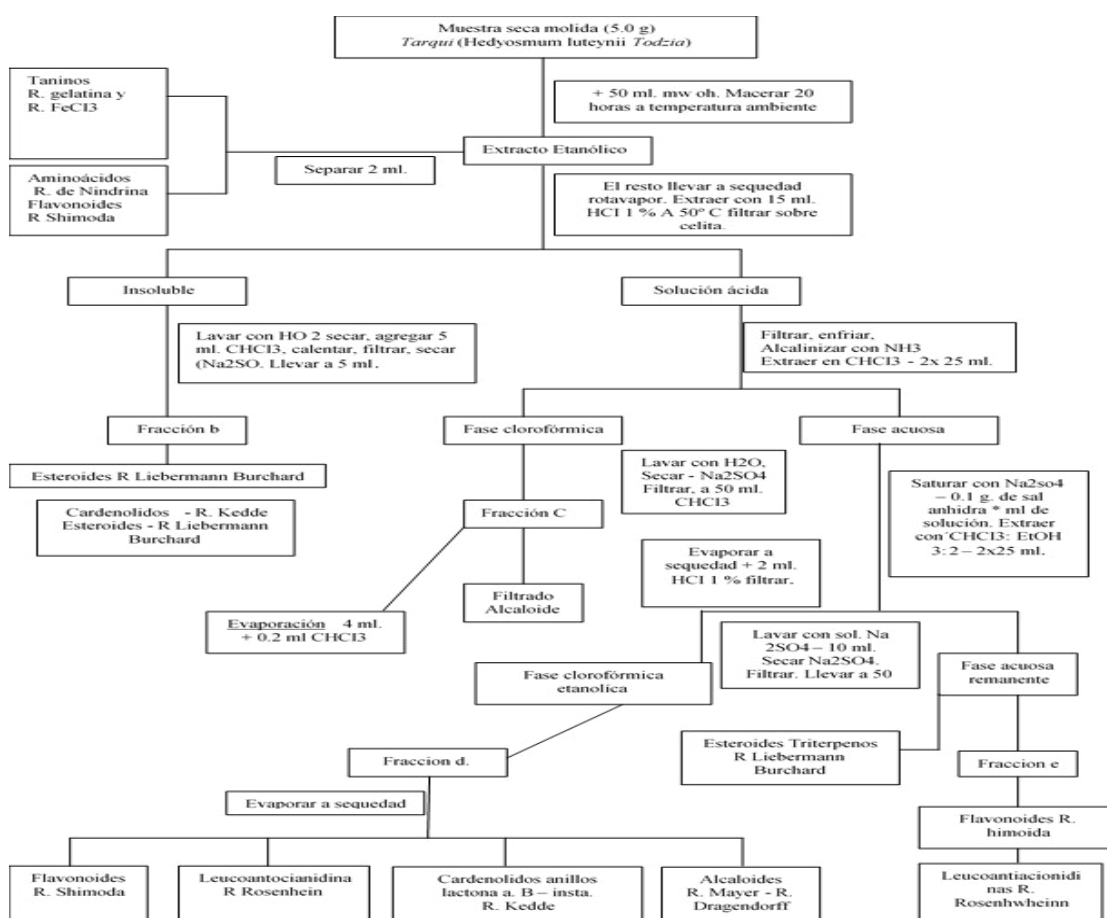


Figura 12: **Marcha fitoquímica preliminar.** Fuente: (Quispillo, 2013)

- Procedimiento para el aislamiento y la purificación de los compuestos secundarios del extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

1. Tratamiento del extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia),

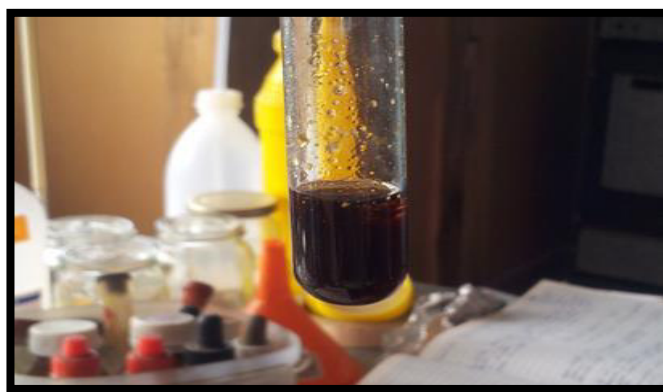


Figura 13: Tratamiento del extracto etanólico de Tarqui

2. Pruebas colorimétricas para determinar presencia de grupos funcionales en el extracto de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia),



Figura 14: Pruebas colorimétricas

3. Eliminación de clorofilas,



Figura 15: Eliminación de clorofilas

4. Obtención de subextractos (tolueno: acetato de etilo 9:1; cloroformo y butanol), a partir del extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia),

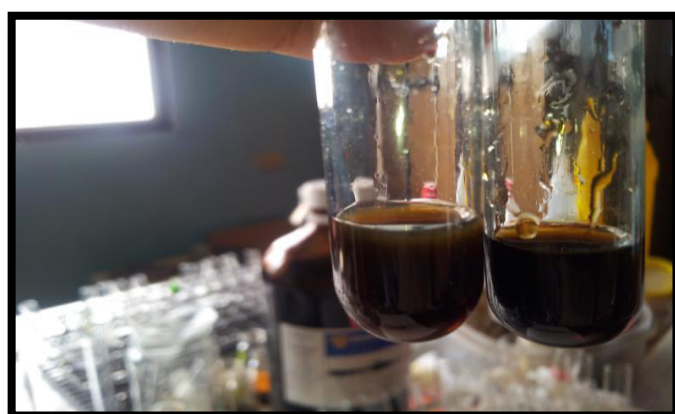


Figura 16: Obtención de subextractos

5. Determinación de grupos funcionales a través de realización de cromatografías de placa fina (CCF), para el extracto etanólico y los sub-extractos de Tarqui.



Figura 17: Cromatografías en capa fina

6. Cromatografía en columna (HPLC) de alícuota de extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se utilizan como solventes de corrido hexano-acetato de etilo-metanol puros y en mezclas en orden ascendente de polaridad; se recojen 33 fracciones,
7. Con las fracciones de la (1) a la (7) se realizó una columna cromatográfica (HPLC) C1, obteniéndose de la fracción (1) un compuesto; de la fracción (2) escasa cantidad, de la fracción (3) no se obtiene nada; fracción (4) mezcla de compuestos; (5), (6), (7), se unifican.
8. Concentración de los extractos de cada una de las fracciones en Rotavapor,
9. Realización de cromatografías en placa (CCF),

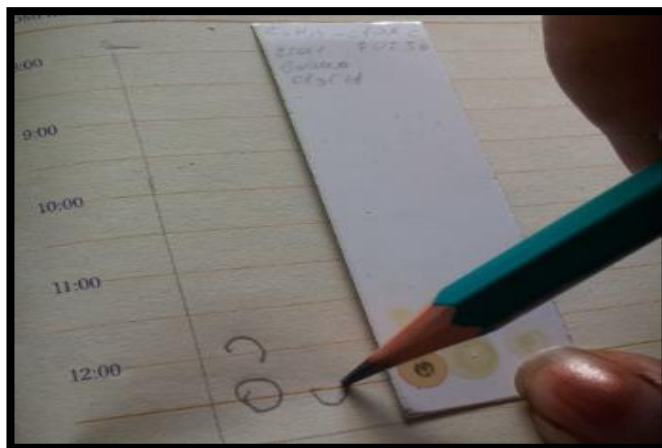


Figura 18: Cromatografías en placa

10. Unificación de fracciones con características similares,



Figura 19: Unificación de fracciones

11. Purificación de las fracciones en columna cromatográfica (HPLC) C2; las fracciones (5), (6), (7) son unificadas y se realizan columnas cromatográficas con solvente de corrido BAW: butanol-ácido acético-agua,

- 5:4:1, como revelador sulfato de cerio, se obtienen dos compuestos como cristales blancos,
12. La fracción (9) se la analiza sola, se presenta como un polvo amarillo, en mayor cantidad y al que se le agregó hexano: acetato de etilo, 5:2 con la formación de compuestos como cristales. Se retiran las aguas madres y se secan los cristales,
 13. De la columna C1, las fracciones de la (20) a la (26), por tener por observación los mismos compuestos, se separan con solvente de corrido acetona: metanol, 1:1 y se revela con sulfato de cerio,
 14. Obtención de compuestos puros, fracción 1, fracciones (10), (11), (12), tres columnas; de las fracciones (18), (19) se obtiene un compuesto (clorofila) con características de cristales; de las fracciones de la (20) – (26) varios compuestos (clorofila),
 15. En la columna cromatográfica (HPLC) C3 se analizan las aguas madres, obteniéndose sólidos en la fracción (2) que es corrida con una mezcla de solventes de hexano: acetato de etilo 80:20.
 16. La columna cromatográfica (HPLC) C4, se estudian todos los cristales obtenidos en la fracción (8) de la C1 y las fracciones (9), (10), (11) de la C2; obteniéndose en la fracción (10) cristales que son solubles en acetato de etilo,
 17. En la columna C6, de las fracciones (8), (9), (10) de C1 y las fracciones (11), (12), (13) de C4, se obtienen cristales más clorofila,
 18. De las fracciones (2), (3), (4) de C6, tratadas con hexano: acetato de etilo, se analizan en columna cromatográfica HPLC, separándose la clorofila de los cristales,
 19. Las fracciones (14) a (18) de C1, tienen cristales amarillos en forma de polvo, solubles en acetato de etilo. Los cristales se dejan reposar en metanol caliente por 72 horas, para posteriormente separarlos por filtración,
 20. De la columna cromatográfica (HPLC) C2, se obtiene un líquido transparente aceitoso que posee un compuesto puro,
 21. De la columna cromatográfica C5, de las fracciones (9) a (11), se obtiene un polvo rojizo que da positivo para flavonoides,

22. Las fracciones (21) a (27) se analizan en varias columnas hasta obtener un sólido que da positivo para terpenos, revelador utilizado ácido sulfúrico-vainillina,
23. El sólido obtenido de las fracciones (21) a la (27) se unifica con el sólido de la fracción (18), se le agrega acetato de etilo: metanol 1:1, y se obtienen pocos cristales amarillos en las paredes del recipiente, que son filtrados; al concentrado se le realiza cromatografías en capa fina (CCF),
24. De la columna C6 la fracción (18), se trata con acetona obteniéndose cristales en el fondo de color amarillo-verdoso,
25. De las fracciones de la (28) a la (32), se realizan tres columnas cromatográficas (HPLC) C7, C8, C9 y se separa en la fracción (6) con benceno un sólido verdoso y un líquido amarillo turbio,
26. Al subextracto butanólico, se le realizó una cromatografía en placa fina (CCF) con soporte de vidrio y sílica gel como adsorbente y empleando como solventes acetato de etilo: metanol 8:2; acetato de etilo: acetona: metanol 4:2:2, observándose dos manchas una verde y una amarilla,
27. Al subextracto butanólico se le realizó cromatografía en columna (HPLC), con solventes hexano: acetato de etilo: metanol, en mezcla 4: 2: 2 y también puros,
28. Se obtienen nueve fracciones, se unen fracciones similares y se realizan dos columnas cromatográficas (HPLC), con solventes de corrido hexano: acetato de etilo, 5:5, obteniéndose las fracciones (3) y (4) que presentan compuestos amarillos que son separados; de las fracciones (11), (12), (13) se obtienen compuestos sólidos de color amarillo.

3.4. Materiales y métodos para el estudio del aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

3.4.1. *Materiales para el estudio del aceite del aceite esencial de Tarqui (Hedyosmum luteynii Todzia)*

Cuadro 14: Materiales para el estudio del aceite esencial del Tarqui (Hedyosmum luteynii Todzia)

Materiales	Procedimiento
Probetas	Para medir volúmenes de forma aproximada.
Pipetas	Para medir la alícuota de un líquido con mucha precisión o transferir una cantidad de un recipiente a otro.
Pinzas	Para sostener objetos de vidrio como embudos, buretas, balones, etc.
Tijeras	Para cortar estructuras blandas en diferentes tamaños.
Vasos de precipitación	Para preparar o calentar sustancias, medir o traspasar líquidos.
Embudo	Instrumento empleado para canalizar líquidos y materiales granulares.

Fuente. Torres et al., 2018

3.4.2. Equipos para el estudio del aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Cuadro 15: Equipos utilizados para la determinación estructural de los metabolitos secundarios del aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Análisis		Equipo		Procedimiento
Pesado muestras	de	Balanza precisión Sartorius	de	Instrumento destinado a determinar la masa de un cuerpo. Se caracteriza por su exactitud precisión y sensibilidad. Capacidad: 220 g. Precisión (≥ 0.001 g)
Licuadao		Licuadao		Equipo utilizado para triturar el material vegetal.
Destilación		Destilador		Equipo utilizado para destilación por arrastre con vapor. Se calentó a ebullición durante 5-6 horas y los volátiles se colectaron en la bureta del Clevenger.
Pesado muestras	de	Balanza precisión Sartorius	de	Instrumento destinado a determinar la masa de un cuerpo. Se caracteriza por su exactitud precisión y sensibilidad. Capacidad: 220 g. Precisión (≥ 0.001 g)
Espectrofotometría		Espectrofotómetro de AA. Marca Thermo Scientific.		Para detectar y determinar cuantitativamente elementos químicos presentes aceite esencial del Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).
Cromatografía		Cromatógrafo de gases		Para identificación de los componentes del aceite esencial

	Hewlett-Packard modelo 5973 serie II	de del Tarqui (<i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia).
Extracto vegetal	Rotavapor Digital IKA TM RV 10	<p>El Evaporador Rotativo presenta un nuevo baño de calentamiento universal, cristalería vertical, características de seguridad de última generación y conectividad digital.</p> <p>Capacidad: 3L</p> <p>Velocidad: de 20 a 280 rpm</p> <p>Rango de temperatura (métrico): 0 a 180°C</p> <p>Ángulo: 0 a 45°</p> <p>Pantalla: Digital</p> <p>Altura (métrico): 430mm</p> <p>Peso (métrico): 20kg</p>

Fuente. Torres et al., 2018

3.4.3. Métodos para el estudio del aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

- ***Extracción del aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).***

Para la obtención de los aceites esenciales de Tarqui, se empleó el método de Clevenger (Carvajal & Quintero, 2012), el mismo que cumple con los estándares internacionales; además de la disponibilidad de los equipos con que cuentan los laboratorios de la Universidad Nacional de Chimborazo, lo que permitió obtener el aceite esencial del Tarqui (*Hedyomum luteynii* Todzia).

Las muestras se conservaron en recipientes adecuados para transportarlas, posteriormente fueron depositadas en los laboratorios de la Universidad Nacional de Chimborazo, en un espacio aséptico y alejado de la humedad.

Antes de realizar los procesos correspondientes se seleccionaron únicamente las hojas sanas, sin imperfecciones (5Kg) a las cuales se les lavó con agua simple y se les sometió a un proceso de trituración (licuadas).

Se colocaron los 5 kg de la muestra de Tarqui (*Hedyomum luteynii* Todzia, hojas frescas de la planta en un balón que soporta el equipo de Hidrodestilación y sometido a una temperatura de 60 °C, para que el alcohol se evapore. Este equipo de destilación permite separar los aceites esenciales, concentrarlos y recolectarlos adecuadamente.

A la muestra de aceites esenciales, se le realiza una serie de análisis con la determinación del peso específico, índice de refracción, índice de acidez. El aceite esencial obtenido se conservó a bajas temperaturas para evitar su volatilización.

En la obtención de los aceites esenciales se consideraron los indicadores que se detallan a continuación:

- Hojas frescas desarrolladas de la planta Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).
- La extracción de los aceites esenciales de un vegetal depende del tamaño del equipo utilizado, por lo que se lo realizó en períodos de hora y media hasta agotamiento de la planta para obtener el máximo rendimiento.
- Los aceites esenciales obtenidos se los conservó en recipientes de vidrio oscuro a una temperatura de 4°C. Su rendimiento fue calculado en base a la masa del aceite y la masa del material fresco utilizado en la extracción (Palá-Paul, 2002).

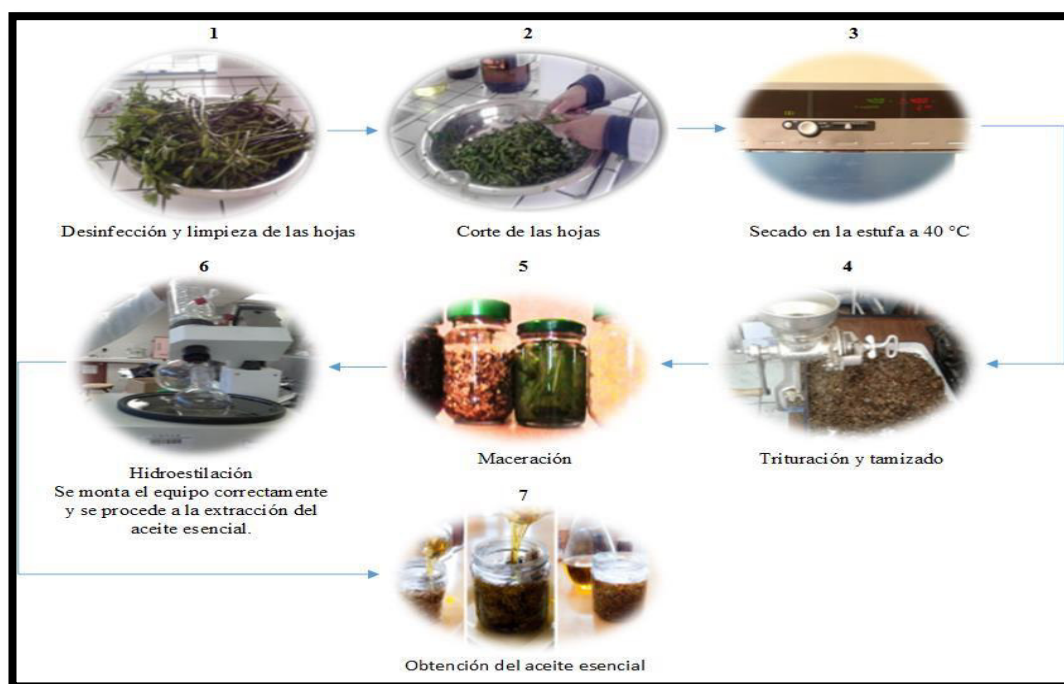


Figura 20: Esquema para la obtención de los aceites esenciales de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia). Fuente: (Torres et al., 2018)



Figura 21: Hojas Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)



Figura 22: Trampa de Clever. Fuente: (Carvajal & Quintero, 2012)



Figura 23: Obtención del aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

3.4.4. Determinación estructural de los compuestos químicos del aceite esencial del Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

- ***Espectroscopía de masas conjugada con cromatografía de gases (EM-CG).***

La determinación estructural de los compuestos presentes en el aceite esencial de Tarqui, se lo efectuó en un cromatógrafo de marca Hewlett-Packard, modelo 5973, serie II, acoplado a una columna capilar HP-5 MS (30 m de longitud, de 0,23 mm de diámetro interno, y un espesor de pared de 0,25 μm). El puerto de inyección a una temperatura de 230 °C y la del cuadrupolo 150 °C (Adams, 2007; Davies, 1990). El gas portador empleado fue el Helio, con un flujo de 0,9 mL/min, con una velocidad lineal de 34 m/s. La fuente de ionización contiene una energía de 70 eV y un rango de barrido de 40-500 amu a 3.9 scans/s. La muestra de aceite esencial (1,0 μL) se diluyó con n-heptano, en una proporción de Split 1:100. Los componentes constituyentes del aceite esencial fueron identificados mediante comparación de sus espectros de masas con los que se encuentran disponibles en las bases de datos de la librería Willey, 6ta. edición y los índices de Kovats reportados en la literatura (Adams, 2007; Davies, 1990).

3.5. Materiales y métodos para la determinación de la actividad microbiológica de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

3.5.1. Materiales para la determinación de la actividad microbiológica del Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Cuadro 16: Materiales para establecer la actividad microbiológica de los aceites esenciales de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Materiales	Actividad microbiológica
Cepas bacterianas	Para reproducción de células bacterianas.
Tubos de ensayo	Para almacenar temporalmente sustancias o muestras (sólidos o líquidos).
Medio de cultivo (Agar nutritivo)	Propicio para desarrollo de microorganismos como hongos, bacterias.
Cajas Petri	Para poder observar diferentes tipos de muestras tanto biológicas como químicas.
Pinzas	Instrumentos que permiten sujetar materiales de vidrio.

Fuente. Torres et al., 2018

3.5.2. Equipos para la determinación de la actividad microbiológica del Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Cuadro 17: Equipos utilizados para estudios de actividad microbiológica de la porción etérea de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Análisis	Equipo	Procedimiento
Pesado muestras	de Balanza precisión Sartorius	de Instrumento destinado a determinar la masa de un cuerpo. Se caracteriza por su exactitud precisión y sensibilidad. Capacidad: 220 g. Precisión (≥ 0.001 g)
Actividad biológica	Incubadora MEMMERT INB400	Para mantener y hacer crecer cultivos microbiológicos y celulares.
Identificación	Microscopio	Para identificar rápidamente objetos que son demasiado pequeños para ser observados a simple vista.
Esterilización	Cámara de flujo laminar	Para proporcionar un caudal de aire a través de un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Absorbing), direccionándolo hacia la parte inferior de la cabina y recirculando al ambiente por la parte frontal, creando una presión que protege la muestra de la contaminación.

Fuente. Torres et al., 2018

3.5.3. Métodos para la determinación de la actividad microbiológica de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

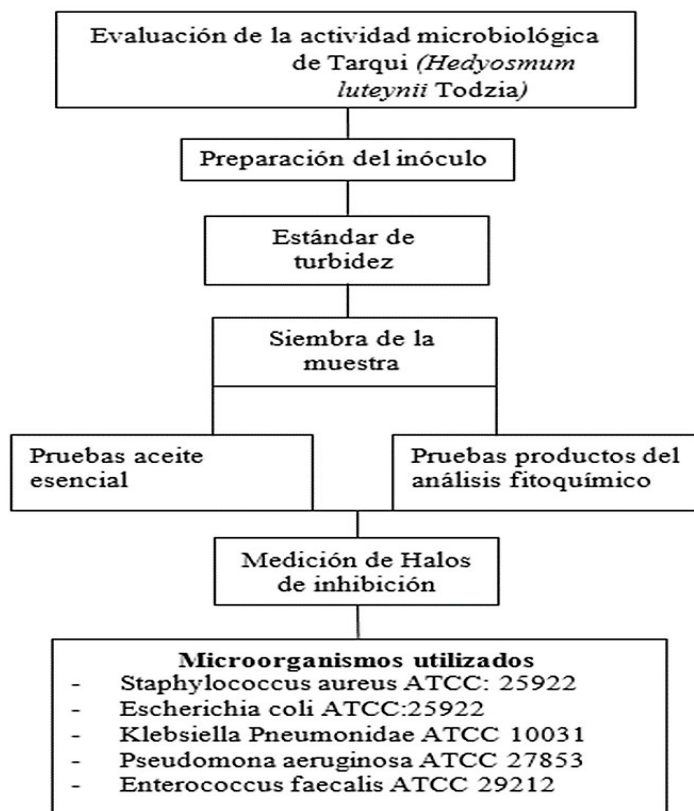


Figura 24: Esquema de evaluación de la actividad microbiológica. Fuente: (Torres et al., 2018)

- **Caracterización microbiológica de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).**

Método Bauer-Kirby, perteneciente a las Organizaciones U.S. Food and Drug Administration (FDA) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) (CLSI, 2018).

Se estudió la actividad antimicrobiana del aceite esencial del extracto etanólico, acuoso y de los productos resultantes del estudio fitoquímico de las hojas desarrolladas de Tarqui (*Hedyomum luteynii* Todzia), haciendo uso de una población de microorganismos entre los que están cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa*, con crecimiento en agar específico.

La técnica empleada se denomina Difusión en agar por diseminación superficial en disco (Bauer-Kirby), adoptada por el CLSI (antes NCCLS) (2018) como norma de aceptación general. Se procedió según se describe: se impregnaron con 10 uL de la solución de extracto (40 mg/mL) discos de papel filtro estéril tipo Whatman N°3 de 5 mm de diámetro. Los discos preparados con la solución a probar se colocaron en placas de vidrio que contienen agar Müller-Hilton y siembra de una suspensión bacteriana de concentración establecida previamente (1×10^8 bacterias/mL) e inoculadas con una solución bacteriana patrón, comparada con un estándar de McFarland 0,5 (CLS, 2018).

Las placas tratadas se incubaron por un período de 12 horas a una temperatura de 5°C, luego a 37 °C por 24 horas adicionales (CLSI, 2018). Las respuestas de presencia de actividad biológica antibacteriana se comprobaron mediante medición del diámetro en mm de los halos donde no hay crecimiento del microorganismo. Cabe mencionar que se emplearon para estas pruebas cepas de bacterias certificadas y pertenecientes al Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Nacional de Chimborazo.

- **Inóculo, preparación.**

Para preparar el inóculo es necesario obtener de 4 a 5 colonias del microorganismo seleccionado, que provienen de cultivos que fueron obtenidos del aislamiento primario de los microorganismos empleados (CLSI, 2018). No se utilizaron cultivos de más de 24 horas. El cultivo es tratado con una solución salina estéril, que también se le conoce como caldo estéril, hasta observar una turbidez en el tubo de ensayo correspondiente al 0,5 de la escala de

McFarland, lo que se considera aproximadamente 10^{6-8} microorganismos vivos por mL (CLSI, 2018).

- **El estándar de turbidez.**

Para preparar el estándar de turbidez se utiliza 0,5 mL de una solución de Cloruro de Bario $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,175 %) y 99, 5 mL de H_2SO_4 0,36 N. Estos componentes se fusionan adecuadamente y se colocan de 6 a 8 mL, en tubos de ensayo con rosca (13x100); una vez completada la acción se cierran herméticamente y se los guarda en una cámara oscura a temperatura ambiente. Cuando se requiere hacer la comparación con los cultivos realizados, se debe agitar el estándar previamente y empleando en lo posible un agitador del tipo vortex (CLSI, 2018).

- **Siembra de la muestra.**

- a. Con un aplicador de algodón estéril, tomar una cantidad de la suspensión que contiene el microorganismo a ser empleado en el estudio. El cultivo debe estar diluido previamente.
- b. Con el aplicador de algodón conteniendo el microorganismo correspondiente, depositarlo encima del nivel del tubo y rotar unos 10° contra las paredes, lo que sirve para remover el exceso existente del inóculo.
- c. Depositar el inóculo lo más uniformemente posible en el medio de cultivo, con el uso del aplicador de algodón estéril. No utilizar los inóculos que estén muy concentrados o muy diluidos.
- d. Secar la superficie del medio de cultivo, por un lapso de tiempo de 5 a 20 minutos, la caja Petri siempre con la tapa cerrada.
- e. Los discos empleados ubicarlos sobre la superficie en la caja Petri que contiene el agar, sirviéndonos de una pinza o un dispensador totalmente estériles, presionar los discos ligeramente con la pinza para provocar el contacto necesario y suficiente.

- f. Distribuir los 6 discos en toda la caja Petri, en la periferia y en el centro de la misma, considerando un espacio de unos 2 cm aproximadamente, controlando que estos espacios sean los adecuados y eviten la imbricación de los halos de inhibición (CLSI, 2018).

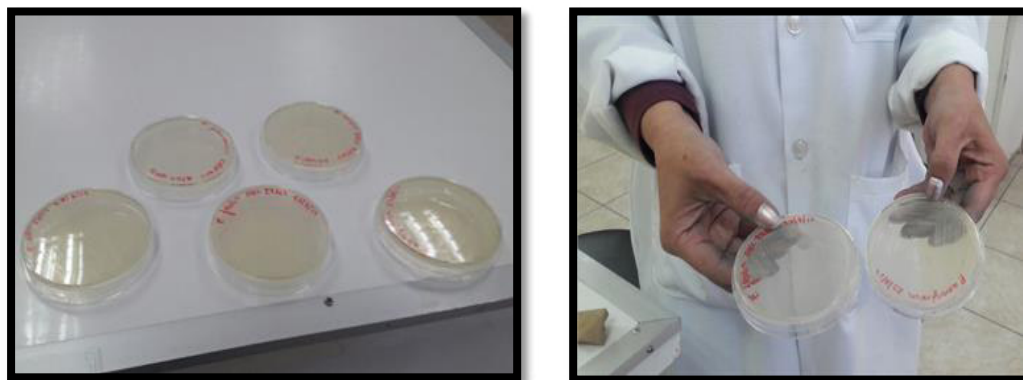


Figura 25: Esquema de ubicación de los microorganismos en el medio de cultivo

- g. Para el crecimiento bacteriano, se deben incubar los microorganismos en las cajas Petri inmediatamente o a más tardar en un tiempo de no más de 30 minutos, a una temperatura de máximo 35 °C, para evitar falsos positivos. No utilizar cámara de CO₂.
- h. Establecer las mediciones correspondientes de 16 a 24 horas de transcurrida la incubación (CLSI, 2018).

- **Preparación de los stocks de la planta de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)**

Para la determinación de la posible actividad medicinal de la planta de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se realizaron pruebas microbiológicas con el aceite esencial, extracto acuoso, etanólico y con los productos obtenidos del análisis fitoquímico desarrollado.

Muestra 1: Aceite esencial, obtenido por hidrodestilación: 100000 ppm.

Muestra 2: Extracto acuoso: 0,0554 g (1108 µl).

Muestra 3: Extracto etanólico: 0,0538 g (1076 µl).

Muestra 4: Columna 1, Fracción 1: Hexano: Acetato de etilo 80:20; peso: 0,0173 g (1730 µl).

Muestra 5: Columna 2, Fracción 3 (C2, F3); Líquido Puro, peso 0,0134 g (1340 µl).

Muestra 6: Columna 2, Fracción 8 (C2, F8); peso 0,0151 g (1510 µl).

Muestra 7: Columna 3, Fracción 1; (C3, F1), Extracto acuoso: cristales; peso 0,0123 g (1230 µl).

Muestra 8: Columna 2, Fracción 8 y 9 (C2, F8, 9); Hexano: Acetato de etilo 80:20; peso 0,0137 g (1370 µl).

Muestra 9: Columna 2, Fracción 9 (C2, F9); peso 0,0035 g (700 µl).

Muestra 10: Compuesto sólido Columna 1, Fracciones 24-27 (C1, F24-27); peso 0,0056 g (1120 µl).

- **Preparación de las muestras de aceite esencial y de los productos del análisis fitoquímico para las pruebas microbiológicas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)**

La muestra que contiene los aceites esenciales fue obtenida de las hojas frescas y desarrolladas de Tarqui, misma que se obtuvo a través de la metodología de Hidrodestilación, con uso de trampa de Clevenger. Se empleó una disolución (stock) en dimetilsulfóxido (DMSO¹⁵, Merck) a la concentración de 100.000 ppm. La dilución a partir de esta solución se realizó igualmente en DMSO a la concentración requerida justo antes de cada ensayo. Los

¹⁵ DMSO: dimetilsulfóxido

productos obtenidos del análisis fitoquímico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), fueron tratados de la misma manera con DMSO y se utilizaron en una concentración de 50000 ppm.

- **Microorganismos utilizados**

Se emplearon las siguientes estirpes microbianas:

- *Staphylococcus aureus* ATCC: 25922
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- *Escherichia coli* ATCC: 25922
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Como antibiótico de control se utilizó Streptomicina 10 µg.

- **Mantenimiento y conservación de microorganismos**

Las bacterias fueron mantenidas en agar nutritivo y las placas conservadas a 4 °C, llevándose a cabo resiembras periódicas (CLSI, 2018).

La conservación de las cepas durante largos periodos de tiempo se realiza por congelación (-20 °C), empleando una suspensión celular de glicerol al 15% (v/v) (CLSI, 2018).

- **Preparación de los inóculos microbianos**

Los inóculos bacterianos se prepararon mediante la selección de 2 a 3 colonias del microorganismo, posteriormente depositado en un medio de cultivo puro por un lapso de 18 horas. Cabe recordar que el grado de turbidez debe estar próximo al tubo 0,5 en la escala de McFarland, lo que manifiesta la presencia de cerca a los 10^{6-8} microorganismos por mililitro (CLSI, 2018).

- **Inoculación de la muestra**

Para este procedimiento, se utiliza una cantidad del microorganismo a ensayar, tomado con un aplicador de algodón estéril de una suspensión contenida en un tubo de ensayo del cual se toma la cantidad necesaria tratando de dejar en el tubo el exceso valiéndose de la frotación del aplicador en las paredes del recipiente (CLSI, 2018). Posteriormente el inóculo se distribuyó uniformemente sobre la superficie del medio Muller-Hinton. El secado del medio de cultivo sembrado se lo debe procurar por un tiempo de 5 a 20 minutos, con la tapa cerrada (CLSI, 2018). Luego ayudados de pinzas estériles para microbiología se colocan los discos sobre el agar presionándolos suavemente para que exista un mayor contacto entre los dos sistemas (CLSI, 2018). Los discos fueron impregnados con 10 µl de las muestras a estudiar. Se incubaron las placas a 37 °C, durante 18 a 24 horas (CLSI, 2018).

- **Medida de los halos de inhibición**

El área de inhibición del crecimiento bacteriano se lo determinó para cada uno de los discos contenidos en la caja Petri y sin remover la tapa, mediante ubicarla contra un plano oscuro y bajo un halo de luz reflejada (CLSI, 2018). Se toman medidas utilizando una regla para medir el diámetro de cada una de las zonas del disco, en la que se deben incluir los 6 mm que corresponden al disco como tal y la zona de inhibición del crecimiento bacteriano (CLSI, 2018).

3.6. Pruebas in vivo, del extracto acuoso de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Las pruebas farmacológicas *in vivo* fueron realizadas en el bioterio de la Universidad Nacional de Chimborazo, con 12 ratones endogámicos (cepa C57BL/6, 20 semanas de edad), adultos, machos.

Los ratones fueron tratados con el extracto acuoso de las hojas desarrolladas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) en dosis: baja (1250 mg), media (2500 mg) y alta (5000 mg, solución salina) (González, Zamora, Luque, Frank y Menéndez, 2007). Los trastornos farmacológicos fueron monitoreados en los tres grupos experimentales y el grupo control (4 x 3 ejemplares), al inicio (Día = 0) y después de 2 semanas (Día = 15) (González et al., 2007).

Los ratones fueron pesados y separados por el método probabilístico de elección aleatoria en cuatro grupos ($n = 3$), identificados a partir de la terapéutica: Control (CTR); Dosis baja (DB); Dosis media (DM); Dosis alta (DA) (González et al., 2007). Los animales fueron mantenidos en jaulas de polietileno, un animal en cada jaula, forradas con aserrín, en fotoperíodo de 12 horas de claro y obscuro, ruidos mínimos, temperatura ambiente $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$, mantenida con aire acondicionado (González et al., 2007). La alimentación fue con ración comercial (Labina®, Purina, Ecuador), con monitorización de la ingestión y agua “*ad libitum*” (González et al., 2007).

3.7. Desarrollo y metodología.

Se desarrolló un diseño experimental y el análisis estadístico de los datos para establecer el mejor material vegetal de la especie forestal nativa Tarqui

(*Hedyosmum luteynii* Todzia) que permitió realizar las correspondientes pruebas: análisis proximal, físicos, químicos, fitoquímicos, de determinación estructural y de comprobación de la posible actividad biológica que podría tener ésta especie vegetal.

1. Elección de factores, niveles y rangos.

Para la elección de los factores preponderantes que influyen directamente en la investigación no es necesario conocerlos de antemano sino más bien durante la realización del experimento visualizar aquellos que se consideren influyen con mayor fuerza o tengan mayor incidencia (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

Para el experimento se seleccionaron 2 variables de diseño:

Cuadro 18: Variables de diseño para el experimento

Factor	Descripción	Tipo	Niveles
Piso altitudinal	Franja de suelo o de vegetación que corresponde a una determinada altitud sobre el nivel del mar.	Cuantitativo	1: 3200 – 3300 msnm
			2: 3300 – 3400 msnm
			3: 3400 – 3500 msnm
Madurez de la hoja	Nivel de maduración de la hoja de Tarqui	Cualitativo	Madura Desarrollada Joven

1.1. Factores de diseño.

- Piso altitudinal.

Para el estudio se establecieron 3 pisos altitudinales:

1: de 3200 a 3300 msnm,

2: de 3300 a 3400 msnm y

3: de 3400 a 3500 msnm.

Es importante indicar que para el desarrollo del presente estudio se establecieron tres pisos altitudinales, debido a que el conjunto de especies del bosque de Jacarón presentan un patrón de distribución más o menos homogéneo. Este tipo de información es útil porque permite conocer cómo interactúan las especies entre sí y con su entorno (ambiente); así como para anticipar su afectación con los cambios futuros y climáticos. En base a lo anterior, se puede decir que la mayor diversidad de especies se encuentra entre los 3200 m.s.n.m., a 3400 msnm y con tendencia a disminuir la biodiversidad a medida se incrementa la altitud (Rodríguez et al, 2017). Los bosques Andinos a pesar de tener una alta posibilidad de auto-recuperación y auto-regeneración propias, necesitan del desarrollo de propuestas y estrategias que permitan la conservación de las especies presentes en la zona, partiendo de la base, de que el presente estudio genera un conocimiento sobre el uso medicinal que podría tener la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) (Jadán, Toledo, Tepán, Cedillo, Peralta, Zea, Castro y Vaca, 2017).

- Madurez de la hoja.

Las hojas de esta especie son potencialmente ricas en aceites, debido a que su estructura (lámina foliar), está completamente formada; de esta manera la hoja consigue capturar la mayor cantidad de luz solar, permitiendo extender de mejor forma la recepción de la energía y un incremento en su reserva energéticas (Ortíz y Martínez, 2018). Por el grado de madurez, las hojas pueden ser maduras, desarrolladas y jóvenes, de donde se debe escoger el tipo con mejor rendimiento en su caracterización fitoquímica.

La “madurez de las hojas es catalogada a partir de la biología reproductiva vegetal, como el estado de desarrollo donde la planta es capaz de cambiar de un estado vegetativo a un crecimiento reproductivo”. En los árboles como el caso del Tarqui, que viven varios años las hojas empiezan a crecer en la parte de las ramas laterales que han ido creciendo durante los años de vida del mismo. Las hojas caen de los árboles viejos, pero en los perennes pueden durar algunos años, siendo que las hojas nuevas o jóvenes se desarrollan en los nuevos brotes (Hoppe, 2001).

Hojas jóvenes: se las conoce como hojas primordiales o catafilos, son las primeras hojas que nacen por encima de los cotiledones de la planta. En especies cuyas hojas normales son compuestas, se presentan con estructuras simples o con un menor número de folíolos y en otras especies se presentan con la misma forma que los monófilos pero de tamaño menor (Hoppe, 2001).

Hojas desarrolladas: son las hojas vegetativas o nomófilos, se generan por el crecimiento de las hojas primordiales o jóvenes y son las que estarán presentes durante toda la permanencia de la vida de la planta hasta llegar a la vejez o senescencia (entendiéndose como el deterioro o muerte de los tejidos). Su morfología es compleja y muy variada dependiendo de la especie vegetal a la que pertenezcan, son las que caracterizan a cada especie en particular (Hoppe, 2001).

Hojas maduras: se las conoce como hojas preflorales, se las observa cuando el vegetal pasa del estado vegetativo al llamado estado floral, la transición generalmente se presenta con cambio en la forma de la hoja, el tamaño del limbo se reduce, los pecíolos se acortan hasta que las hojas se vuelven sésiles y la coloración de las hojas es característica. Generalmente son de color verde, pero pueden contener pigmentos complementarios y su permanencia en el vegetal sin ser la fotosíntesis es la protección de las flores o de las inflorescencias, su tamaño es muy variable (Hoppe, 2001).

1.2. Factores constantes.

- Etapa de recolección

Las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) fueron recolectadas en los meses de julio y agosto por conocerse que es la época del año donde esta especie nativa alcanza su mayor desarrollo fenológico.

- Método de recolección de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

La recolección del material vegetal de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se realizó en todas las ocasiones con la misma metodología de los árboles marcados previamente, en las parcelas diseñadas en los tres pisos altitudinales del bosque de Jacarón, se recolectaron las hojas a mano y seleccionando hojas maduras, desarrolladas y jóvenes, que preferentemente no presenten daños en su estructura.

- Limpieza de las hojas

Las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) una vez recolectadas del bosque de Jacarón, fueron trasladadas a los Laboratorios de Química, lavadas con agua potable y con una solución de hipoclorito de sodio al 2% con el propósito de evitar crecimiento de microorganismos.

- Estufa utilizada para secado

Procesos como el análisis proximal, determinación de humedad, secado de muestras de hojas, requieren de una estufa, en la presente investigación se utilizó un equipo de marca Memmert, con temperaturas controladas de 40°C, lo que evita la descomposición y la conservación de los compuestos químicos posiblemente activos biológicamente que están presentes en el Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

1.3. Factores no controlables.

- Humedad del aire

Los laboratorios donde se desarrollaron los análisis para investigar los principios activos de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) fueron los Laboratorios de Química y Microbiología de las Facultades de Ingeniería y de Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo, de la ciudad de Riobamba - Ecuador, donde se maneja una humedad ambiental variable que podría afectar los experimentos desarrollados pero que es un factor difícil de controlar.

1.4. Determinación de la variable de respuesta.

- Diseño de experimentos considerando el porcentaje de grasa en las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

Para seleccionar el material vegetativo viable de la especie forestal nativa Tarqui, se realizó el análisis proximal en hojas maduras, desarrolladas y jóvenes, tomadas de los tres pisos altitudinales del bosque de Jacarón, con el propósito de establecer las hojas que contengan el mayor porcentaje de grasa (aceites esenciales), es decir, una mayor presencia de principios activos que evidencien el carácter medicinal a la especie forestal.

Variable de respuesta: porcentaje de grasa.

Criterio: mientras más, es mejor.

- Diseño de experimentos para porcentaje de proteína en las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

El segundo factor considerado fue el porcentaje de proteína presente en las hojas maduras, desarrolladas y jóvenes de los tres pisos altitudinales del

bosque, por considerarse las proteínas las estructuras fundamentales de los compuestos terpénicos base de los principios activos de las especies vegetales.

Variable de respuesta: porcentaje de proteína.

Criterio: mientras más, es mejor.

1.5. Elección del Diseño Experimental.

En un diseño experimental se consideran 5 factores que son los que inciden fuertemente en el mismo y que podrán ser modificados de acuerdo a la necesidad particular:

- Objetivo de realizar un experimento
- Cantidad de factores necesarios de estudio
- ¿Cuántos niveles deben ser probados en cada factor?
- Efectos: motivos de investigación y su relación factor-respuesta.
- Presupuesto económico del experimento, tiempo y precisión buscada (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

En nuestro caso, para el primer punto, el objetivo del experimento es conocer qué piso altitudinal y qué madurez de la hoja aportan más grasa y proteína, por lo que se busca un diseño que estudie el efecto de varios factores sobre la respuesta, dentro de esta clasificación se encuentran los diseños factoriales 3^k , del tipo completamente aleatorizado (Montgomery, 2013).

En respuesta al punto 2 y 3, se tienen 2 factores y cada uno con tres niveles, por lo que un diseño factorial 3^2 es el ideal para nuestro caso.

Sobre el punto 4, nos interesa conocer si los factores o variables independientes, tienen influencia sobre el porcentaje de grasa y proteína que tiene una hoja de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

Finalmente, para responder el punto 5, se cuentan con los recursos necesarios para realizar dos experimentos factoriales completos, lo que equivale a realizar 2 réplicas, además debido a que nuestra unidad experimental es una hoja de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se desea una precisión de 2 decimales en el porcentaje de grasa y proteína.

2. Realización del experimento.

2.1. Condiciones previas

Los Laboratorios donde se desarrollaron los análisis para investigar los principios activos de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) fueron los Laboratorios de Química y Microbiología de las Facultades de Ingeniería y de Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo, de la ciudad de Riobamba, Ecuador.

Los análisis fueron realizados por la Dra. Silvia Torres y un grupo de 3 estudiantes de Ingeniería Agroindustrial, adecuadamente capacitados en los procesos.

La materia prima para los análisis son las hojas maduras, desarrolladas y jóvenes de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

2.2. Planeación y organización del trabajo experimental

Un factorial completo 3^2 equivale a 9 corridas, en nuestro caso se realizarán 2 réplicas del modelo factorial completo, por lo que se tendrán 18 corridas.

Cada vez que se realice una nueva corrida se usará una hoja diferente. Las corridas se realizarán según el orden aleatorio que se obtenga mediante el programa Minitab 18 y en el horario fijado para cada una.

2.3. Procedimiento

- Cuantificación del porcentaje de grasa o extracto etéreo por el método de Goldfish Gc.R. Lees, (1969), en extracto de hojas frescas de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) (Cuello, Jaramillo, Canchingre, Pérez, Castro y Cabrera, 2017).
- a. Los balones de destilación previamente deberán ser lavados con agua destilada y secados en una estufa a 105 °C por un tiempo de 2 horas, luego retirarlos y colocarlos en un desecador, enfriarlos y pesarlos. Añadir 200 mL de solvente hexano.
 - b. La muestra de Tarqui se pesó de 1 - 2 gramos y se colocó en un cartucho de papel filtro limpio y tapado con una torunda de algodón.
 - c. Colocar el cartucho que contiene la muestra dentro del dedal y armar el equipo de Goldfish, con el balón que contiene el hexano, acoplar el refrigerante con agua fría y extraer la grasa por alrededor de 7 horas.
 - d. Al culminar la extracción, sacar el balón con el residuo y secarlo en una estufa a 105 °C por siete horas más, posteriormente retirar el balón de la estufa y depositarlo en un desecador, enfriar y pesar, registrar el peso.
 - e. Aplicar la ecuación siguiente:

Ecuación 1: Cálculo del porcentaje de grasa

$$EE = \frac{Pvr - Pv}{Pm} * 100$$

En donde:

EE = extracto etéreo (%)

Pv = peso de balón tarado

Pvr = peso del balón más el residuo

Pm = peso de la muestra.

- Cuantificación de la proteína total mediante Kjeldahl, según Método 2.057 A.O.A.C 1984 en hojas de la especie forstal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) (Jimenez, 2008).

a. Digestión:

En un tubo de digestión se coloca 1 gramo de muestra, se añaden 5 gramos de catalizador, con 10 mL de H₂SO₄, grado técnico al 92%.

Los tubos de digestión preparados se colocan en el digestor Kjeldahl con los calentadores a 500 °C, hasta observar que la solución adquiriera una coloración verde, lo que indica la completa digestión de la materia orgánica. Posteriormente se retiran del equipo y se enfrían.

b. Destilación:

En el destilador se coloca la muestra estudiada, a la que se le añaden 70 mL de NaOH al 40%, se realiza el proceso de destilación y se recoge el producto en 25 mL de ácido bórico al 4%.

c. Titulación:

En esta etapa para la titulación, se añaden a la muestra 2 gotas de indicador mixto y se titula con HCl al 0,02N, hasta observar cambio de color en la solución. Es necesario una titulación con un blanco para comparación.

d. Cálculos:

Los cálculos se los efectúa con la siguiente fórmula:

Ecuación 2: Cálculo del porcentaje de proteína

$$\%P = \frac{(M_a - M_b) * N * 0.014 \times 6.25}{Pm} * 100$$

En donde:

% P = porcentaje de proteína

N = normalidad del ácido titulante

Ma = mililitros de ácido gastado en la muestra

Mb = mililitros de ácido gastado en el blanco

Pm = peso de la muestra en gramos

6.25 = factor proteico del nitrógeno

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados

4.1.1. Análisis fitoquímico para determinar los principios activos de la especie forestal nativa Tarqui (Hedyosmum luteynii Todzia)

4.1.1.1. Análisis proximal o bromatológico de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

El análisis fitoquímico se realizó mediante diferentes técnicas como el análisis proximal para la determinación cualitativa de los metabolitos secundarios de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia). Para el análisis estadístico se utilizaron tres tipos de hoja (madura, desarrollada y joven), distribuidos en los tres pisos altitudinales considerados en el bosque de Jacarón.

Para la interpretación de los resultados se consideró un nivel de confianza del 95%.

Cuadro 19: Resultados del análisis proximal de las de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Piso altitudinal	Madurez de las hojas	Humedad %		Cenizas %		Fibra %		Proteína %		Grasa %	
Piso altitudinal 1	Madura	5,42	5,37	3,23	3,3	4,96	5,02	15,5	14,78	1,56	1,49
	Desarrollada	5,64	5,69	3,2	3,18	4,1	4,19	16,75	16,98	2,65	2,58
	Joven	6,04	6,12	2,33	2,27	3,19	3,23	16,28	16,59	1,57	1,5
Piso altitudinal 2	Madura	4,56	4,63	3,24	3,21	5,14	5,09	16,83	16,78	2,99	2,92
	Desarrollada	5,09	5,15	3,08	3,1	4,58	4,61	17,98	17,75	3,89	3,77
	Joven	6,96	6,91	2,72	2,67	3,95	3,99	16,2	16,55	1,68	1,52
Piso altitudinal 3	Madura	2,44	2,36	3,21	3,19	4,13	4,22	15,87	15,32	1,24	1,2
	Desarrollada	3,63	3,59	3,16	3,13	4,4	4,5	17,34	17,21	2,39	2,34
	Joven	4,82	4,92	2,07	2,1	3,68	3,75	15,97	15,94	1,09	1,04

Fuente. Análisis proximal por Torres, S., 2017

A los datos anteriores, se les realizó tratamiento estadístico mediante diseños de experimentos 3^2 a los porcentajes de grasa y proteína, debido a que son los factores que influyen mayormente en el contenido de los principios activos presentes en la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

Sin embargo, se pueden obtener conclusiones del resto de variables como porcentajes de humedad, cenizas y fibra, así:

- Porcentaje de humedad

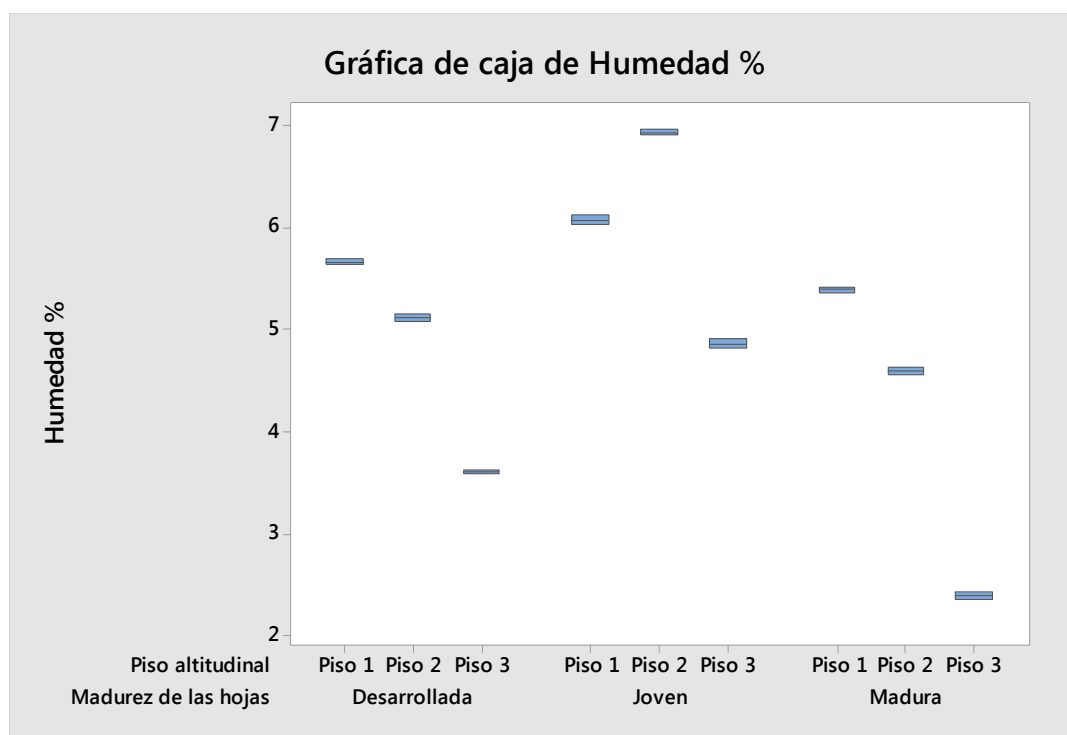


Figura 26: Boxplot del porcentaje de humedad. Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

La variación del porcentaje de humedad en el tratamiento de las hojas de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) van desde 2,36%

para hojas maduras hasta 6,96% para hojas jóvenes, valores que se encuentran dentro de los parámetros establecidos por la normativa (Antunes y Quirós, 2017).

- Porcentaje de cenizas

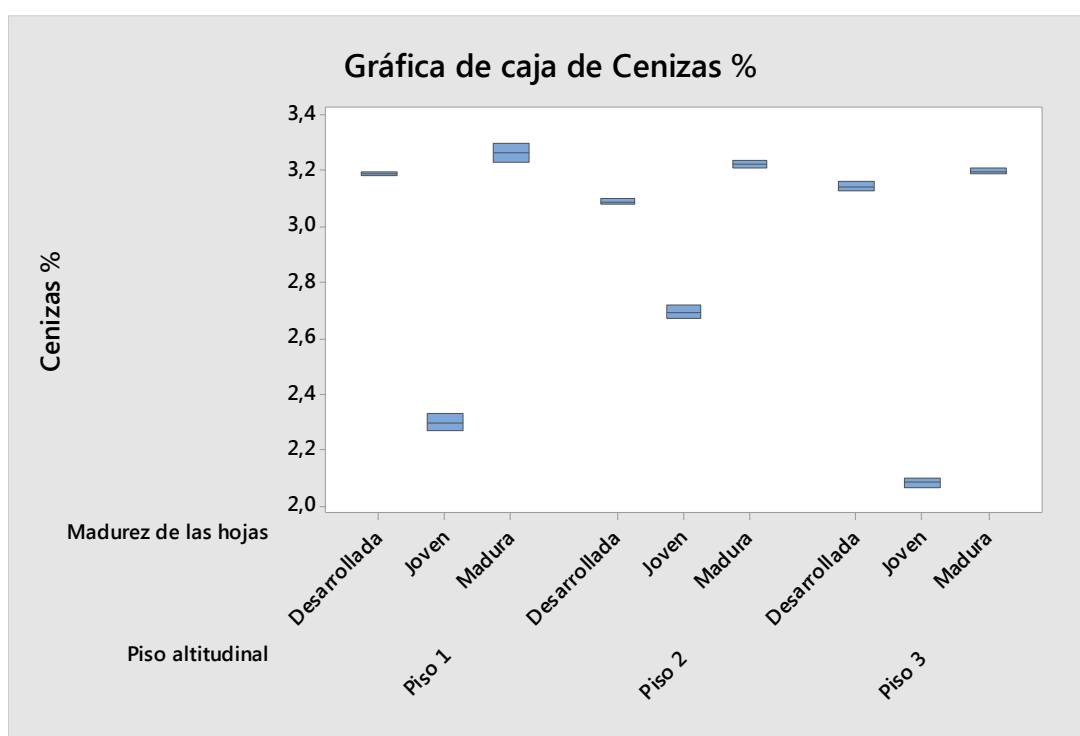


Figura 27: Boxplot del porcentaje de cenizas totales. Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

En la Figura anterior se muestran los resultados de la determinación de cenizas totales en las hojas maduras, desarrolladas y jóvenes de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), valores que van desde 2,07% hasta 3,3% y concuerdan con los estudios realizados por Saavedra (2016).

- Porcentaje de fibra

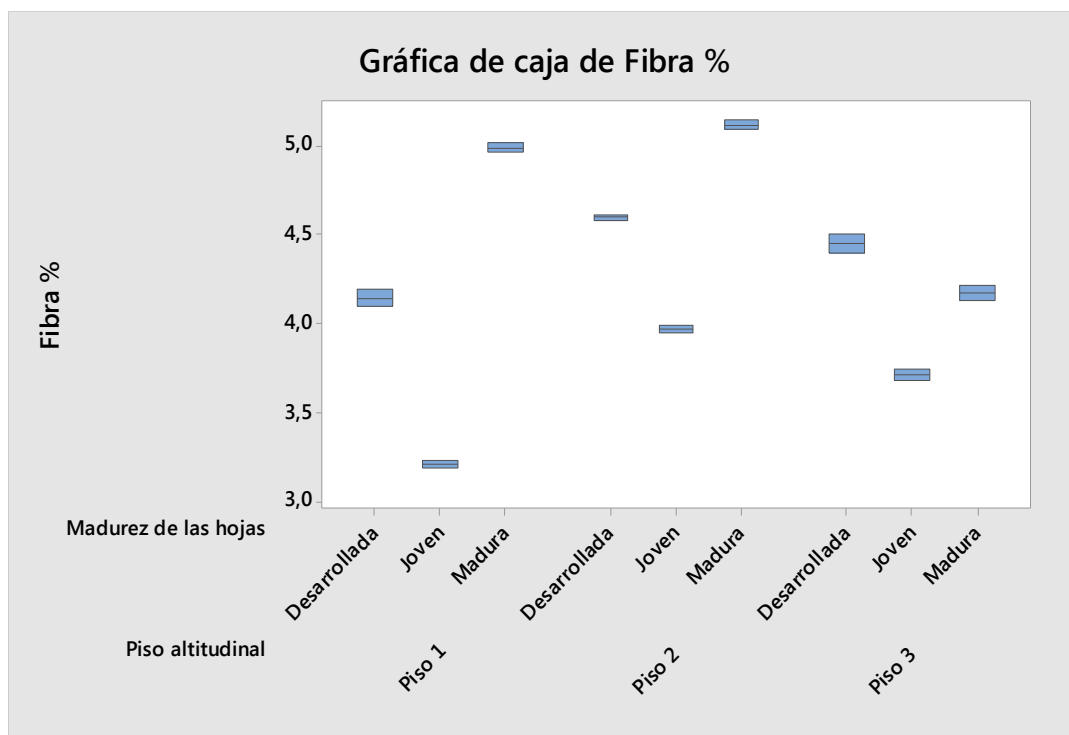


Figura 28: **Boxplot del porcentaje de fibra.** Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

En la determinación de la variable fibra en las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se observan valores que van desde 3,19% hasta 5,14%, esta variación se debe básicamente a las condiciones edafológicas y climáticas en donde se desarrolla la planta. Es importante también indicar que el estado vegetativo o condiciones fisiológicas son las que determinan la variación de la composición química de las hojas (Saavedra, 2016).

4.1.2. Caracterización cualitativa fitoquímica de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

4.1.2.1. Análisis cualitativo de la caracterización fitoquímica del extracto etéreo vegetal de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

Los diferentes tipos de metabolitos secundarios encontrados en una especie vegetal, resultan muy útiles para describir las propiedades de una planta. Los metabolitos secundarios derivan de metabolitos primarios que son sus precursores lo que establece una interconexión entre ambos (Saavedra, 2016; Hernández, 2011).

Para el análisis fitoquímico cualitativo, cuantitativo, microbiológico y otros se trabajó con hojas desarrolladas, del piso altitudinal 2 de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) debido a que los diseños de experimentos 3² y análisis estadísticos realizados en hojas maduras, desarrolladas y tiernas de los tres pisos altitudinales del bosque de Jacarón realizados para cumplir con el objetivo de selección del mejor material vegetativo viable indicaron que tienen las mejores condiciones de porcentajes de grasa y proteína.

Cuadro 20: Análisis cualitativo de la caracterización fitoquímica del extracto etéreo, de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Tratamiento	Aceites y grasas			Lactonas y cumarinas			Triterpenos y esteroides			Alcaloides		
	Ensayo de Sudan			Ensayo de Baljet			Ensayo de Liebermann-Burchard			Ensayo de Dragendorff	Ensayo de Mayer	Ensayo de Wagner
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3			
Hojas desarrolladas, Piso altitudinal 2	+++	++	+++	+	+	+	+++	+++	++	-	-	-

Interpretación: Abundante: +++ Moderado: ++ Escaso: + Negativo: -

Fuente. Análisis fitoquímico cualitativo por Torres, S., 2017

En este cuadro se observan respuestas positivas para la presencia de aceites y grasas, lactonas y cumarinas y en mayor proporción triterpenos y esteroides, además se observa la ausencia de alcaloides en las pruebas colorimétricas, en los análisis de las hojas desarrolladas del piso altitudinal 2 de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia). Esto indica que esta especie vegetal contiene compuestos químicos posiblemente bioactivos que y que corroboraría el uso tradicional como planta medicinal por los habitantes de esta zona.

4.1.2.2. Caracterización cualitativa fitoquímica del extracto alcohólico de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

Cuadro 21: Caracterización cualitativa fitoquímica del extracto alcohólico de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Tratamiento	Catequinas			Quinonas	Azúcares Reductores			Lactonas y cumarinas			Antocinidinas			Triterpenos y esteroides			Fenoles y taninos		
	Ensayo de catequinas			Ensayo de Borntrager	Ensayo de Fehling			Ensayo de Baljet			Ensayo de Antocianidinas			Ensayo de Liebermann-Burchard			Ensayo de FeCl3		
	R1	R2	R3		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Hojas desarrolladas, Piso altitudinal 2	++	++	+	-	++	+	++	++	++	+	+	+	+	++	++	++	++	+	++

Tratamiento	Saponinas			Aminoácidos			Flavonoides			Cardenólidos		Alcaloides			
	Ensayo de la espuma			Ensayo de la minhidrina			Ensayo de Shinoda			Ensayo de Kedde	Ensayo de Dragendorff	Ensayo de Mayer	Ensayo de Wagner		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3						
Hojas desarrolladas, Piso altitudinal 2	++	++	++	++	+	++	++	++	++	-	-	-	-		

Interpretación: Abundante: +++ Moderado: ++ Escaso: + Negativo: -

Fuente. Análisis fitoquímico cualitativo por Torres, S., 2017

4.1.2.3. Caracterización cualitativa fitoquímica del extracto acuoso de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

Cuadro 22: Caracterización cualitativa fitoquímica del extracto acuoso de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Tratamiento	Azúcares Reductores			Principios Amargos			Fenoles y taninos			Saponinas			Flavonoides			Alcaloides		
	Ensayo de Fehling			Ensayo de principios Amargos			Ensayo de FeCl3			Ensayo de espuma			Ensayo de Shinoda			Ensayo de Dragendorff	Ensayo de Mayer	Ensayo de Wagner
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3			
Hojas desarrolladas, Piso altitudinal 2	++	++	+	++	+	++	++	+	++	++	++	+	++	++	++	-	-	-

Interpretación: Abundante: +++ Moderado: ++ Escaso: + Negativo: -

Fuente. Análisis fitoquímico cualitativo por Torres, S., 2017

4.1.3. Análisis fitoquímico del extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

En el mundo las plantas constituyen una fuente de provisión de recursos variados para las comunidades rurales aledañas, (Torres et al., 2016). La flora del Ecuador es una de las más ricas tanto en plantas nativas como en las introducidas; muchos de estos vegetales son utilizados en la medicina ancestral por las personas generalmente de las poblaciones aledañas a la ciudad que conservan el uso de vegetales, especialmente en la terapia de enfermedades. Se considera que alrededor del 80% de la población del Ecuador recurre a la medicina tradicional, basada en el empleo de las plantas y sus derivados, para cubrir necesidades de aliviar enfermedades, dolencias o únicamente a modo de prevención de las mismas (Ríos, Borgtoft, Granda y Koziol, 2007).

El uso y comercio de los extractos de plantas medicinales se mantienen como una práctica activa en los mercados de las ciudades. Su obtención está basada en la extracción de porciones biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas; lo que constituye para la industria farmacéutica una fuente de nuevas moléculas con efectos farmacológicos deseados y un mínimo de efectos secundarios, aspecto que permite satisfacer las necesidades crecientes del uso de los productos naturales (Torres et al., 2016).

Para la elaboración de un extracto se tomo en cuenta, las características etnobotánicas de la planta, sus principios activos, técnicas de separación e identificación de los mismos y los fines de empleo (Bermúdez et al., 2005). Las síntesis de metabolitos secundarios en la planta, los cuales constituyen los principios activos, está relacionada con los mecanismos de defensa (Bermúdez et al., 2005).

El proceso de obtención a partir de los extractos vegetales es variable; se pueden obtener extractos acuosos, polvos o utilizar otros disolventes para obtener diferentes compuestos según su polaridad (Berdonces, 1995), su

distribución no es uniforme por toda la planta hay que tener en cuenta la época de recolección y la preparación que se las deba hacer a cada una de las plantas (Ansaloni et al., 2010).

Diversos productos derivados de las plantas han mostrado un efecto biológico que los caracteriza como principios activos. Entre estos compuestos se destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, taninos, aceites esenciales, alcaloides, entre otros. Estos compuestos tienen actividades diferentes; que en muchos casos no han sido dilucidados por completo (Ansaloni et al., 2010).

Las hojas del árbol de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), son utilizadas por los moradores de la parroquia Columbe, como vegetal medicinal para el tratamiento de problemas de amigdalitis y úlceras estomacales, no existiendo antecedentes de estudios previos de esta especie en particular, por lo que se desconoce la composición química de los metabolitos secundarios que le podrían conferir el carácter de medicinal (Torres et al., 2016).

Se procedió a obtener los extractos de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), para luego aislarlos, purificarlos e identificar los metabolitos secundarios por procesos físicos, químicos y espectroscópicos. El análisis fitoquímico se lo realizó a partir del extracto etanólico obtenido de las hojas desarrolladas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), para la posterior identificación de los compuestos químicos, los que a través del estudio microbiológico se pudo establecer son los que le confieren la actividad biológica al Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

4.1.3.1. *Propiedades físico-químicas del extracto etanólico de Tarqui (Hedyosmum luteynii Todzia).*

Cuadro 23: Evaluación organoléptica y físico-química del extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Parámetros organolépticos y físico-químicos	Resultados
Aspecto	Líquido
Color	Pardo opaco
Sabor	Ligeramente amargo
Olor	Aromático, agradable, medianamente picante
Materia seca	6,78 g/L
Humedad	98,49 %
Cenizas	1,71%
Densidad relativa	0,97g/L
Sólidos totales	196 ppm
pH	6,29 a 17,5 °C
Nitrógeno total	0,34 - 0,53 g/L
Carbohidratos reductores	9,2 -12,6 g/L
Proteínas	0,22 g/L

Fuente. Torres et al. 2016

Como fue descrito en el procedimiento de obtención del extracto etanólico, se emplearon hojas limpias y sanas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), en una cantidad de 2000 g que fueron licuados con 8 litros de Etanol al 96%, se maceró la mezcla en recipientes de vidrio por 72 horas, luego se filtró, se desechó el material vegetal sólido y la solución obtenida se concentró por medio de un rotavapor a un volumen de un (1) litro, que fue puesto en un recipiente de vidrio ámbar en refrigeración a 8 °C para su estabilización y posteriores estudios (Torres et al., 2016).

La evaluación organoléptica y físico-química de los extractos constituye uno de los procesos importantes en el estudio fitoquímico, pues nos permite orientar el trabajo y establecer los tratamientos a seguir para determinar los compuestos con posibles efectos terapéuticos de la especie estudiada (Torres et al., 2016).

Como se observa en el cuadro anterior, el extracto presentó un valor de pH ligeramente ácido. Según (Ahrazem, Rubio-Moraga, Nebauer, Molina y Gómez-Gómez, 2015); estos valores de pH caracterizan a los extractos con independencia de la fuente de materia prima y tecnología empleada. Esta acidez presentada puede estar relacionada con la presencia de compuestos de naturaleza oleosa de bajo peso molecular (AGCC¹⁶), de los que se tiene referencias que evidencian actividad beneficiosa en el tracto gastrointestinal de organismos vivos.

Alam & Saqib (2015), pronuncian que las diferentes tecnologías empleadas para la obtención de los extractos vegetales podrían incidir en la calidad y cantidad de los compuestos presentes. Así mismo los autores mencionados indican que las estructuras químicas de los compuestos extraídos de las plantas dependerían de la naturaleza, tipo de materia prima y de la parte de la planta estudiada.

Los valores de proteína medida como cantidad de Nitrógeno y ceniza en las muestras estuvieron en el rango planteado para este tipo de extracto (Alam & Saqib, 2015).

En el extracto se identifican carbohidratos con un bajo contenido de azúcares reductores lo cual pudiera ser importante en evaluaciones biológicas porque según (Napoli, Siracusa, Saija, Speciale, Trombetta, Tuttolomondo, La Bella, Licata, Virga, Leone, Leto, Rubino y Ruberto, 2015); su alta presencia en organismos vivos puede provocar fermentaciones indeseadas en el intestino grueso, además muchos de estos pueden ser reconocidos como antígenos

¹⁶ AGCC: ácidos grasos de cadena corta.

con lo cual se suelen presentar reacciones de hipersensibilidad que inducen cambios en las bilis del intestino, aumentando la secreción de mucus y desembocando finalmente en diarrea. Es posible que en este indicador estén incluidos residuos de oligosacáridos, los cuales alcancen el tracto posterior sin ser digeridos y allí sean fermentados por las bacterias intestinales lo cual favorece el crecimiento de las bacterias beneficiosas (Brito, Coutinho, Talvani, Coronel, Barbosa, Vega, Figueredo, Tintino, Lima, Boligon, Athayde y Menezes, 2015).

Los niveles de proteínas encontrados son bajos, lo cual es ventajoso pues los altos niveles en los organismos alteran la pared intestinal, destruyen las vellosidades y de forma general afectan el proceso digestivo (Alam & Saqib, 2015). Alam & Saqib (2015) mencionaron que las quinonas pueden captar productos azufrados y los acetaldehídos producen reacciones para generar piranoantocianinas, siendo estas más estables, pudiendo mantener propiedades como el color y el olor que caracteriza a las plantas a las que pertenecen.

4.1.3.2. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

Cuadro 24: Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) para la identificación de grupos funcionales

Grupo fitoquímico	Prueba	Resultado
Saponinas	Espuma	Espuma blanca (xxx)
Fenoles	Fe Cl ₃ Benedict	Precipitado verdoso (xxx)
Quinonas	NaOH	No presencia (-)
Flavonoides	H ₂ SO ₄	Precipitado blanco (xx)
Flavonoides	Shinoda	Efervescencia, solución

		parda, precipitado (xx)
Alcaloides	Dragendorff	No presencia (-)
Alcaloides	Wagner	No presencia (-)
Terpenos	Rosenthaler	Precipitado verde oscuro (xx)
Monoterpenos	Sudan III	Película rojiza (xx)

Interpretación: (-) Negativo, (x) Escaso, (xx) Mediano, (xxx) Abundante

Fuente. Torres et al. 2016

En el cuadro anterior se muestran los resultados del tamizaje fitoquímico realizado al extracto etanólico de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia). Este producto fue sometido a las pruebas fitoquímicas cualitativas con fin de evaluar la presencia de los principales metabolitos secundarios presentes en la composición química de la planta. Se puede observar la presencia de compuestos de varios grupos funcionales, en los que predomina la presencia de saponinas, flavonoides y en especial terpenos.

Al analizar los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico realizado al extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se comprueba la diversidad de metabolitos secundarios con respuestas positivas presentes en el Tarqui, entre los que se destacan Fenoles, Saponinas y Terpenos, los cuales pudieran ser los compuestos que ejercen una acción terapéutica potencial y propiciar inclusive la elaboración futura de productos farmacéuticos.

El resultado fue positivo para la prueba de polifenoles y la coloración azul intensa indico fenoles en cantidad considerable, lo cual se debe a que estos compuestos están íntimamente relacionados con la actividad de repelencia por las plantas a poblaciones de insectos (Torres et al., 2016) y al ser las hojas el blanco más común, es lógico que estos metabolitos sean empleados en defensa química (Granica, Kluge, Horn, Matkowski, & Kiss, 2015).

Las saponinas, se atribuyen a la actividad biológica, asociada a su toxicidad, en cuanto a la actividad hemolítica; se las considera capaces de formar complejos con los compuestos esteroides presentes en la membrana celular de los eritrocitos, produciéndose una mejor impermeabilidad de las paredes celulares, lo que contribuye a disminuir la probabilidad de ruptura de la membrana del eritrocito y la correspondiente pérdida de la hemoglobina (Mena, Tamargo, Salas, Plaza, Blanco, Otero y Sierra, 2015).

Los Flavonoides tienen la función de oxidar macromoléculas, absorbiendo electrones para estabilizar su estructura, sus electrones apareados en un proceso oxidativo que constituye una cadena "Y" que en sí mismo es dañino. Independientemente cuando se encuentran en las plantas estos compuestos son capaces de afectar a compuestos celulares como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, produciendo un gran daño e incluso la muerte celular (Mena et al., 2015).

Los terpenos en las plantas les confieren propiedades características como olor agradable, sabor picante, y efectos farmacológicos antiinflamatorios. La presencia de estos compuestos se ha evidenciado en las hojas de frutos cítricos como el limón y la mandarina, cuyas propiedades han sido explotadas para uso industrial como feromonas para trampas de insectos y anti alimentos para plagas (Pacheco, 2012).

Los Fenoles presentes en las plantas en altas concentraciones son considerados antinutricionales, debido a que forman complejos insolubles con proteínas, carbohidratos y otros polímeros del alimento, lo cual disminuye su digestibilidad (Chaparro, Badri & Vivanco, J., 2014). Nuestro estudio sugiere que las hojas de Tarqui son una buena alternativa para el estudio de los principios terapéuticos, atribuidos por los pobladores.

De los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de Tarqui, se observan grupos funcionales que podrían conferirle a esta especie vegetal la actividad biológica medicinal investigada, dentro de estos

grupos están: flavonoides, saponinas y terpenos, los cuales registran mayor presencia en cada uno de las pruebas desarrolladas para su caracterización.

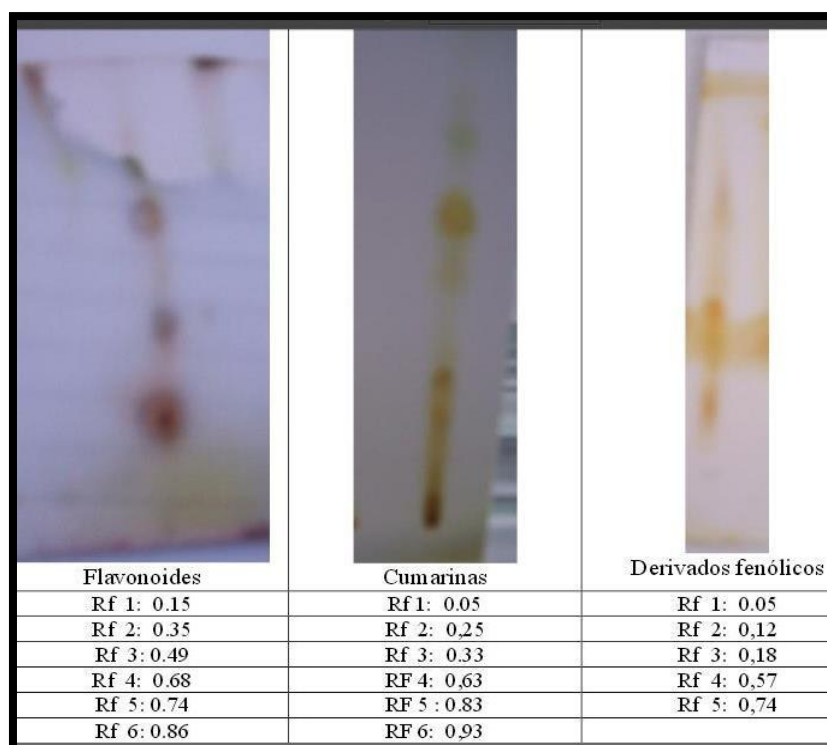


Figura 29: CCF. Extracto etanólico de Tarqui. Fuente: Torres et al. 2016

4.1.3.3. Separación y purificación de metabolitos secundarios del Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

Con el propósito de aislar y purificar los compuestos de los principios activos obtenidos en el Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se utilizaron métodos de cromatografía en capa delgada y en columna, con diversas mezclas de solventes y como base sílica gel (Antunes y Quirós, 2017).

- **Tratamiento del extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).**

Se realizaron cromatografías preliminares en capa fina con extracto hexánico, etanólico, de acetato de etilo y acuoso de Tarqui, observándose la presencia de compuestos en el extracto etanólico, por lo que se tomó la decisión de trabajar sobre este extracto. Con la muestra (extracto etanólico concentrado) de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se prepararon subextractos con Tolueno, Acetato de Etilo 9:1, y Cloroformo. Del subextracto con tolueno en el embudo de separación se obtienen dos fases: la superior transparente y la inferior ligeramente amarilla (Antunes y Quirós, 2017).

Del subextracto con acetato de etilo se obtienen dos fases la superior transparente y la inferior completamente amarilla; mientras que el subextracto con cloroformo se obtiene un precipitado café aceitoso y en la parte superior anillos transparentes, solución que al añadirle butanol se separan en dos fases una superior aceitosa de color café y la inferior de color amarillo.

Estas pruebas confirman la presencia de saponinas, fenoles y terpenos, por lo que con los subextractos mencionados se procedió a realizar cromatografías preliminares para separar los metabolitos secundarios presentes en la planta en estudio.

Cromatografía Preliminar en Capa Fina (CCF) 1:

Fase estacionaria: sílica gel en placa de aluminio.

Solvente: hexano: acetato de etilo 70:30.

Revelador: vainillina (para determinar saponinas).

Muestras:

1.-Extracto etanólico,

2.-Subextracto de tolueno,

3.-Subextracto de cloroformo.

Resultados: presencia de saponinas en el extracto etanólico.



Figura 30: **Cromatografía CCF 1.** Fuente: Torres et al. 2016

Cromatografía en columna: CC1:

Fase estacionaria: sílica gel

Solvente: hexano: acetato de etilo 70:30.

Revelador: vainillina (para determinar saponinas).

Muestras: Extracto etanólico,

Resultados: Se obtienen 7 fracciones. A estas fracciones se les trata a través de cromatografía en capa delgada, obteniéndose los siguientes resultados:

Fracción 1: se obtiene un compuesto (Rf: 0,8).

Fracción 2: se obtienen dos compuestos (Rf1: 0,6) (Rf2: 0,76) (poca

cantidad) para purificación.

Fracción 3: no se observan componentes se elimina esta fracción.

Fracción 4: se obtiene una mezcla de compuestos (R_f1 : 0,34) (R_f2 : 0,31) (R_f3 : 0,76) (R_f4 : 0,1), se purifica en cromatografía en microcolumna.

Fracción 5: se obtienen dos compuestos (R_f1 : 0,23) (R_f2 : 0,45).

Fracción 6: se obtienen tres compuestos (R_f1 : 0,07) (R_f2 : 0,23) (R_f3 : 0,45).

Fracción 7: se obtienen tres compuestos (R_f1 : 0,07) (R_f2 : 0,22) (R_f3 : 0,21), por tener componentes similares se unen las fracciones 5, 6 y 7.

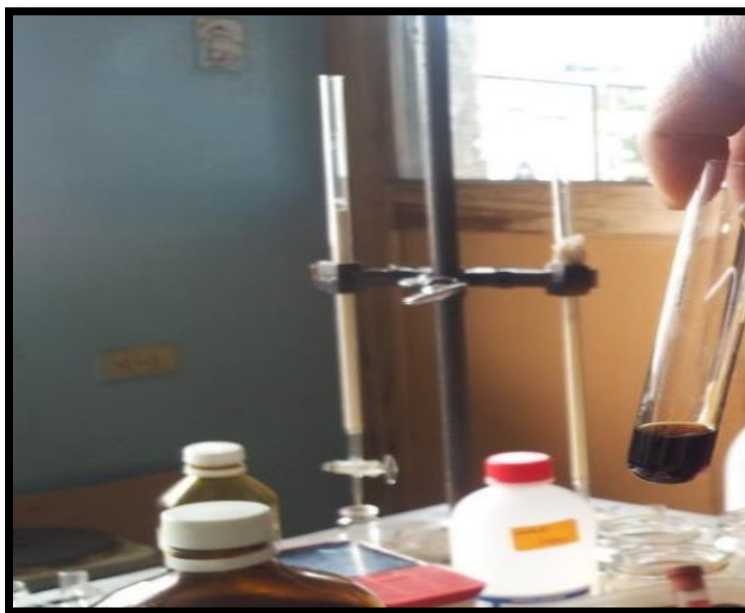


Figura 31: Cromatografía HPLC 1. Fuente: Torres et al. 2016

Cromatografía preliminar 2:

Fase estacionaria: sílica gel en placa de aluminio.

Solvente: cloroformo ácido acético glacial: metanol: agua 60:32:12:8:

Revelador: vainillina (para determinar saponinas)

Muestras: 1) Subextracto Tolueno, 2) Subextracto Acetato de Etilo, 3) Subextracto Cloroformo.

Resultados: poca presencia de compuestos, se observan 4 compuestos pertenecientes al grupo funcional saponinas.

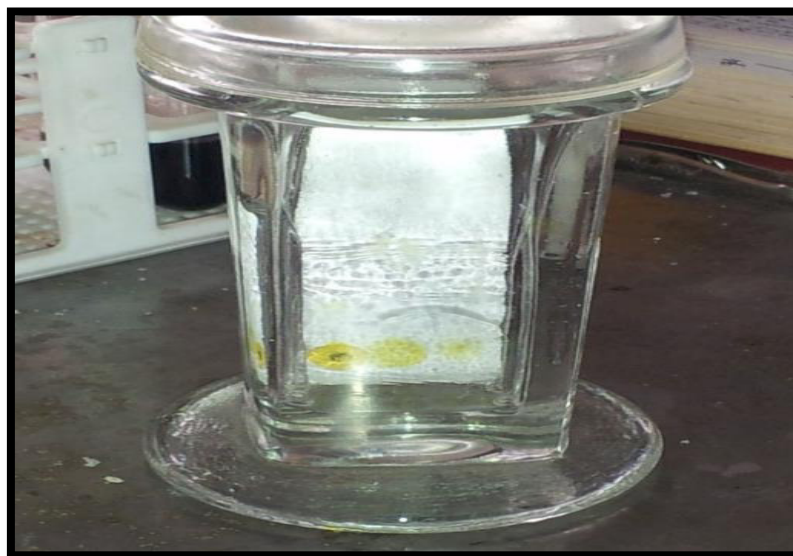


Figura 32: Cromatografía CCF 2. Fuente: Torres et al. 2016

Cromatografía en columna de fracciones: HPLC fracciones:

Fase estacionaria: sílica gel.

Solvente: hexano / acetato de etilo / etanol.

Revelador: vainillina (para determinar saponinas).

Muestras: Fracciones 5, 6, 7 de la Cromatografía en columna 1.

Resultados: Se obtienen 12 fracciones:

Fracción 1: Solvente: hexano,

Fracción 2, 3, 4, 5: Solvente: hexano/ acetato de etilo 8:2,

Fracción 6, 7: Solvente: hexano/ acetato de etilo 7:3,

Fracción 8, 9, 10: Solvente: hexano/ acetato de etilo 5:5,

Fracción 11: Solvente: acetato de etilo: 10.

Fracción 12: Solvente: etanol: 10.

A estas fracciones se les realiza cromatografía en capa fina, obteniendo los siguientes resultados:

Cromatografía en Capa Fina de fracciones: CCF 2 fracciones:

Fase estacionaria: sílica gel en placa de aluminio.

Solvente: Hexano: acetato de etilo 50:25.

Muestras: Fracciones 9, 10, 11 (Rf9: 1,5), (Rf10: 0,35), (Rf11: 4,2).

Resultados: La Fracción 8 cristaliza y es el componente que se encuentra en mayor cantidad. Se unifican las Fracciones 7, 9, 10 y 11 por tener presencia de cristales y se les realiza cromatografía en micro columna (C4, C5, C6), mientras que a las aguas madres se les realiza una micro columna (C3). De las columnas C4, C5 y C6 se obtiene un polvo cristalino, que podría corresponder a un compuesto puro.

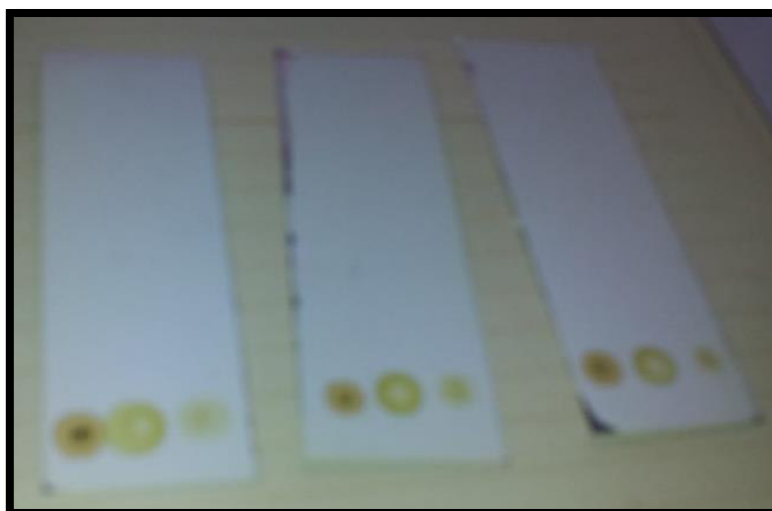


Figura 33: Cromatografía CCF 2. Fuente: Torres et al. 2016

Cromatografía en columna 2: HPLC 2:

Fase estacionaria: sílica gel en placa de aluminio.

Solvente: butanol: ácido acético: agua 50:40:10.

Revelador: sulfato de cerio (para determinar dobles enlaces).

Resultados: Se obtienen siete porciones o fracciones, a las cuales se les efectúa cromatografía TLC, obteniendo los siguientes resultados:

Fracción 7: se obtiene un compuesto (Rf1: 0,41).

Fracción 8: se obtiene un compuesto (Rf1: 0,41).

Fracción 9: se obtienen cuatro compuestos con (Rf1: 0,37) (Rf2: 0,41) (Rf3: 0,88) (Rf4: 0,23).

Fracción 10: se obtienen tres compuestos (Rf1: 0,36) (Rf2: 0,47) (Rf3: 0,88)

Fracción 11: (Rf1: 0,04).

Fracción 12: se obtienen cuatro compuestos con los (Rf1: 0,04) (Rf2: 0,41) (Rf3: 0,5) (Rf4: 0,9).

Fracción 13: se obtienen dos compuestos (Rf1: 0,04) (Rf2: 0,88), a los que por sus características se les deja cristalizar.

Se puede determinar como resultados de esta cromatografía que se tratan de compuestos pertenecientes al grupo funcional flavonoides. Se unifican las fracciones 6, 7 y 11, por tener compuestos similares, a las que se les realiza cromatografía en columna para purificar los compuestos. Las fracciones 8, 9, 10 y 11 se las analiza mediante cromatografía en columna.



Figura 34: Cromatografía HPLC 2. Fuente: Torres et al. 2016

Cromatografía en columna fracciones: HPLC 3 fracciones:

Fase estacionaria: sílica gel.

Solventes: hexano / acetato de etilo / metanol.

Revelador cromatografía capa fina (CCF): Sulfato de cerio.

Muestras: Fracciones 8, 9, 10 y 11, de la Cromatografía en columna 2.

Resultados: Se obtienen 15 fracciones:

Fracción 1: Solvente: hexano 10.

Fracción 2, 3, 4(cristales), 5, 6, 7, 8: Solvente: hexano/ acetato de etilo 8:2,

Fracción 9, 10, 11, 12: Solvente: acetato de etilo 10,

Fracción 13, 14: Solvente: acetato de etilo/ metanol 5:5,

Fracción 15: Solvente: metanol 10,

A estas fracciones se les realiza cromatografía en capa fina, obteniendo los siguientes resultados:

Cromatografía en Capa Fina de fracciones: CCF 3 fracciones:

Fase estacionaria: sílica gel en placa de aluminio.

Solvente: Hexano: acetato de etilo: metanol 45:25:15.

Muestras: Fracciones 8, 9, 10, 11.

Resultados: Se unen las fracciones de la 4 a la 8 por presentar componentes en forma de cristales, los mismos que se les disuelve en metanol y hexano, formándose una capa inferior transparente que corresponde al metanol y una capa superior amarilla que corresponde al hexano.

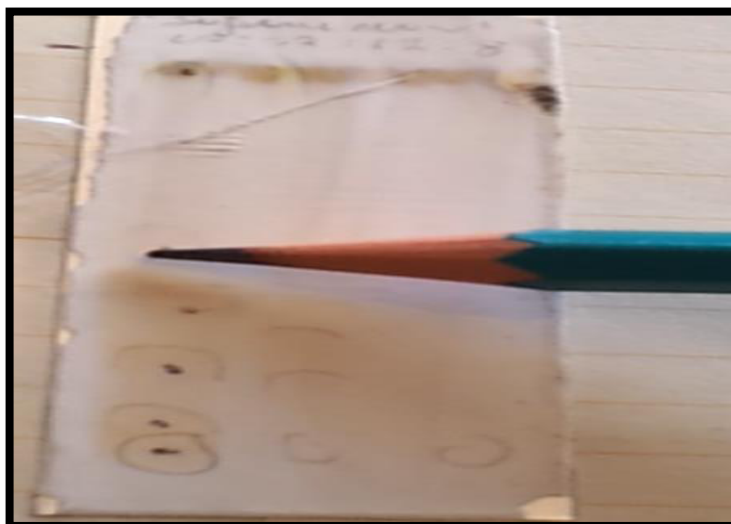


Figura 35: Cromatografía CCF 3. Fuente: Torres et al. 2016

Cromatografía en columna: HPLC 4:

Fase estacionaria: sílica gel en placa de aluminio.

Solvente: butanol: etanol: amoniaco 5:5:1.

Muestras: Fracciones 8, 9, 10, 11.

Revelador: Hidróxido de sodio (verde amarillento).

Resultados: Se obtienen 13 fracciones, obteniéndose los siguientes resultados:

Fracción 14: se obtiene un compuesto (Rf1: 0,9).

Fracción 15: se obtienen dos compuestos (Rf1: 0,11) (Rf2: 0,82).

Fracción 16: se obtienen dos compuestos (Rf1: 0,76) (Rf2: 0,8).

Fracción 17: se obtiene un compuesto (Rf1: 0,14).

Fracción 18: se obtiene un compuesto (Rf1: 0,14).

Fracción 19: se obtienen cinco compuestos con los (Rf1: 0,05) (Rf2: 0,11) (Rf3: 0,14) (Rf4: 0,20) (Rf5: 0,79)

Fracción 20: se obtienen cinco compuestos: (Rf1:0,05) (Rf2: 0,11) (Rf3: 0,14)

(Rf4: 0,27) (Rf5: 0,80).

Fracción 21: se obtiene un compuesto (Rf1: 0,07).

Fracción 22: se obtiene un compuesto (Rf1: 0,07).

Fracción 23: se obtienen cristales.

Fracción 24: no se observan compuestos.

Fracción 25: no se observan compuestos.

Fracción 26: solución parda aceitosa.



Figura 36: Cromatografía en columna: HPLC 4. Fuente: Torres et al. 2016

Se determinaron que de estas cromatografías se deben unir las fracciones del 14 al 18 por tener características similares de sólidos pastosos. Luego se les trató con hexano y metanol formándose una capa inferior verde y una capa superior amarillo claro.

Se unen las fracciones 19 y 20 se les trata con hexano y acetato de etilo 1:9, se deja reposar y hay la formación de cristales que son separados de la solución madre que es desechada. La fracción 23 presenta formación de cristales y la fracción 26 un líquido espeso pardo aceitoso.

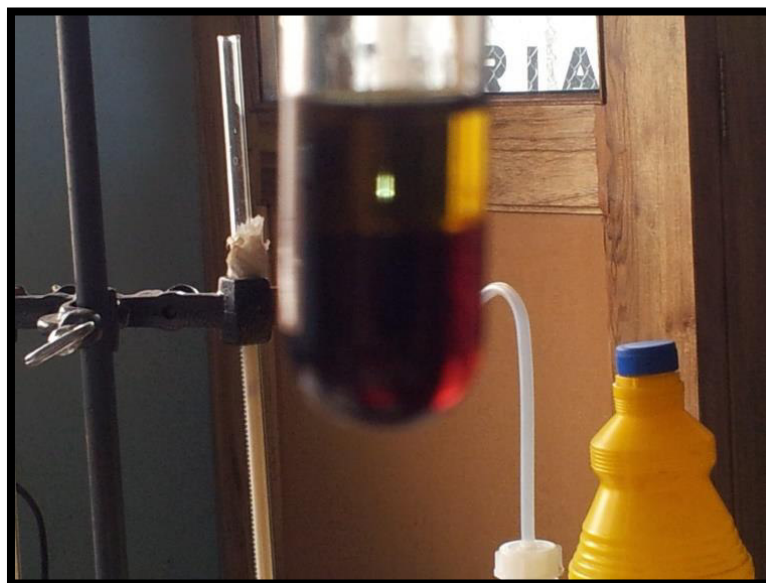


Figura 37: HPLC 4. Fuente: Torres et al. 2016

- **Productos obtenidos del proceso de aislamiento y purificación del extracto etanólico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).**

Partiendo de 2 kg de hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) y al procesar el extracto etanólico se obtuvieron los siguientes productos:

1. **Producto 1:** Columna 1 Fracción 1 (C1, F1): Hexano: Acetato de etilo 80:20; compuesto con un peso: 0,0173 g.
2. **Producto 2:** Columna 2, Fracción 3 (C2, F3); líquido aceitoso puro con un peso de 0,0134 g.

3. **Producto 3:** Columna 2, Fracción 8 (C2, F8); compuesto sólido con un peso de 0,0151 g.
4. **Producto 4:** Columna 3, Fracción 1 (C3, F1); compuesto sólido cristalino; con un peso de 0,0123 g.
5. **Producto 5:** Columna 2, Fracción 8 y 9 (C2, F8, 9); Hexano: Acetato de etilo 80:20; compuesto sólido con un peso de 0,0137 g.
6. **Producto 6:** Columna 2, Fracción 9 (C2, F9); compuesto sólido blanco con un peso de 0,0035 g.
7. **Producto 7:** Columna 1, Fracciones 24-27 (C1, F24-27); cristales amarillos con un peso de 0,0056 g.

Los siete productos descritos fueron utilizados para la realización del análisis microbiológico del Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), con cinco cepas de microorganismos para verificar la actividad medicinal de esta planta.

Para la determinación estructural de los compuestos presentes en el Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se lo realizó con el aceite esencial, debido a que los productos obtenidos a través del screening fitoquímico se obtuvieron en cantidades muy pequeñas, que no permitieron tal elucidación.

4.1.4. Determinación de la estructura química de los aceites esenciales de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

4.1.4.1. Descripción de la configuración química del aceite esencial de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

Del proceso de hidrodestilación se obtuvieron 5 ml de aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), con un rendimiento de 0,071% (0,071 mL/100 gramos de hojas tratadas). El aceite esencial obtenido presenta un olor característico agradable eucaliptico. Los constituyentes del aceite

esencial se listan en el Cuadro siguiente y se puede observar que se encontraron 28 compuestos que corresponden al 98,62% del total de los constituyentes químicos presentes en el aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

Todos los constituyentes son del tipo terpeno, principalmente monoterpenos $C_{10}H_{16}$ (83,21%) y sesquiterpenos $C_{15}H_{24}$ (13,73%). Sin embargo, dentro de estos tienen más importancia los hidrocarburos (96,94%) frente a los oxigenados (2,13%). El hecho de que los hidrocarburos superen a los oxigenados se debe a que al actuar como vectores de polinización o controladores del potencial hídrico los hidrocarburos pueden liberarse con mayor facilidad (Palá Paúl, 2002).

Los cuatro componentes más abundantes (suman 63,42%) fueron clasificados como monoterpenos. La prevalencia de monoterpenos en el aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) es comparable a lo reportado para otras de las especies *Hedyosmum*. También, se han encontrado prevalencia de los monoterpenos en *Hedyosmum mexicanum* (Mundina et al. 1999), *Hedyosmum bonplandianum* (Mundina et al. 1999), *Hedyosmum arborescens* (Sylvestre et al. 2007), *Hedyosmum brasilense* (Kirchner et al., 2010; Murakami et al., 2017), *colombianum* (Delgado et al. 2010), *Hedyosmum angustifolium* (Lorenzo et al. 2003), y *Hedyosmum scambrum* (Lorenzo et al., 2003; Morocho, 2015).

En general, el predominio de monoterpenos en el aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) responde a las características del medio donde se desarrolla esta especie (bosque montano alto, 3200 – 3480 m). Los suelos de estos bosques retienen grandes cantidades de agua y esta abundancia de agua hace difícil la liberación de terpenoides al medio, tal como se reporta para *Eryngium corniculatum*. Lam (Palá Paúl, 2002). Por lo tanto en el aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) son abundantes aquellos componentes con menor peso molecular que podrán ser desprendidos más fácilmente que aquellos de mayor peso molecular (Palá Paúl, 2002). En el aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), con mayor

abundancia se encuentran en una proporción (>3%) son: α -felandreno (32,72 %), α -pineno (13,20 %), (*Z*)- β -ocimeno (10,99%), silvestreno (6,51%), biciclogermacreno (5,05), 1,8-cineol (4,95%), (*E*)- β -ocimeno (3,88%) y germacreno D (3,20%). Los resultados sugieren que la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) presenta una ruta biosintética donde los compuestos hidrocarburos monoterpénicos más potenciada que los otros tipos de terpenos.

En el siguiente cuadro, se puede observar que los constituyentes más abundantes encontrados en el Tarqui son diferentes de los reportados en las otras especies del mismo género *Hedyosmum* en el Ecuador, Perú, Bolivia, Colombia, Venezuela, Brasil, Costa Rica y Guadalupe. No obstante, estas diferencias se pueden deber a factores externos a las mismas plantas, como las propiedades del suelo donde crecen las plantas, disponibilidad de agua y de la gestión de territorio por los gobiernos seccionales.

Cuadro 25: Identificación de los compuestos del aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) por CG-EM

Número de compuesto	Compuesto	Tiempo de retención	Área %	Índice Kovats calculado	Índice Kovats tabulado
1	α -tuyeno	5,09	0,54	927	924
2	α -pineno	5,25	13,20	934	932
3	sabineno	6,12	2,06	966	969
4	β -pineno	6,22	2,63	969	974
5	mirceno	6,50	1,17	978	988
6	α -felandreno	6,90	32,72	990	1002
7	o-cimeno	7,41	2,37	1005	-
8	silvestreno	7,53	6,51	1008	1025
9	1,8-cineol	7,62	4,95	1012	1026

10	(Z)- β -ocimeno	7,74	10,99	1017	1032
11	(E)- β -ocimeno	8,03	3,88	1030	1044
12	linalol	9,55	1,79	1093	1095
13	p-cimeno	11,00	0,40	1144	-
14	cis-chrysanthenol	11,52	0,65	1161	1160
15	borneol	11,66	0,45	1166	1165
16	terpinen-4-ol	12,01	0,57	1176	1174
17	α -terpineol	12,44	0,46	1189	1186
18	β -elemeno	18,85	0,51	1392	1389
19	(E)-cariofileno	19,72	0,34	1418	1417
20	γ -cadineno	21,46	1,09	1479	1513
21	germacreno D	21,61	3,20	1484	1484
22	biciclogermacreno	22,07	5,05	1500	1500
23	α -muuroleno	22,16	0,37	1503	1500
24	germacreno A	22,33	0,54	1508	1508
25	cis-Muurola-3.5-diene	22,63	0,45	1518	-
26	δ -amorphene	22,84	0,54	1524	1511
27	germacreno B	23,84	0,99	1556	1559
28	amorpha-4.9-diene <7,14-anhidro->	24,44	0,65	1574	-

Fuente. Resultados de la determinación estructural por Torres, S., 2017

Nota: Se resaltan los compuestos presentes en cantidades mayores al 3%

Un análisis comparativo entre los constituyentes del aceite esencial de la especie forestal nativa Tarqui(*Hedyosmum luteynii* Todzia) y de otras especies del género *Hedyosmum* reportados en la literatura (Zaruma, 2015), permitió descartar los compuestos comunes. Este análisis arrojó como resultado que de los 28 compuestos identificados en el aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se han identificado como exclusivos de

la especie *Hedyosmum luteynii*: silvestreno (6,51%), cis-muurola 3-5-diene (0,45%), amorpho-4.9-diene <7,14-anhidro-> (0,65%).

El silvestreno ha sido tema de controversia los últimos 100 años y algunos investigadores sugieren que no es un hidrocarburo natural y que es un artefacto que se produce durante la extracción (Panda 2008). Así, por ejemplo, Ballesteros, Claramunt, Sanz del Castillo y Teso (2013) reportaron que la acidez generada durante la destilación en corriente de vapor puede producir isomerización de 2-careno en silvestreno.

La controversia surgió porque el punto de ebullición del silvestreno es alrededor de los 175 °C, así que es natural preguntarse ¿Es el silvestreno un producto de la hidrodestilación de un compuesto que se encuentra de manera natural en el material vegetal? (Ballesteros et al., 2013). Una alternativa interesante para responder esta pregunta es considerar un mecanismo de transporte no convencional, similar a los que se usan para el crecimiento de cristales por transporte químico (Ballesteros et al., 2013).

Con esta técnica, en lugar de vaporizar un sólido (líquido) directamente a altas temperaturas, se puede vaporizar a temperaturas (T_1) mucho más bajas formando intermedios químicos altamente volátiles con un elemento que sirve de transportador y haciendo reaccionar la mezcla de gases resultante a una temperatura (T_2) diferente utilizando la dependencia de la temperatura del equilibrio químico implicado ($T_2 < T_1$) (Binnewies, Glaum, Schmidt & Schmidt, 2013; Nitsche, Bölsterli & Lichtensteiger, 1961).

A pesar de esta controversia, existe un buen número de análisis de aceites esenciales donde se reporta al silvestreno como un constituyente del aceite. Así, Kumari, Pundhir, Priya, Jeena, Punetha, Chawla, Jafaree, Mondal & Yadav (2014) reportaron al silvestreno como un constituyente del aceite esencial en la fruta, flores, partes aéreas y hojas en la familia de plantas: *Apiaceae/Umbrelliferae*, *Asteraceae/Compositae*, *Myrtaceae*, *Zingiberaceae*, y *Piperaceae*. De manera similar, Liu, Wang, Song, Zou, Wang & Sun (2017)

reportaron valores de silvestreno de 17 a 25% en plantas de *Zanthoxylum bungeanum* Maxim (Rutaceae) cultivadas por 11 años.

Gallucci, Placeres, Porto, Barbizan, Costa, Marques, Benevides & Figueiredo (2010) reportaron la existencia de silvestreno en el aceite esencial de hojas de *Eugenia uniflora*. Sin embargo, esta es la ocasión primera en que se evidencia al compuesto silvestreno como un componente de relevancia presente en un aceite esencial en una de las especies pertenecientes al género *Hedyosmum*, de plantas con flores pertenecientes a la familia Chloranthaceae.

La planta de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), es usada por los nativos del Ecuador para el dolor de estómago, preparación de bebidas aromáticas, dolor abdominal, diurético, diaforético, digestivo, afrodisiaco, antiséptico, neuralgias, reumatismo, calambres estomacales (United Nations Industrial Development Organization, 2006).

Algunos de los principales constituyentes del aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) han mostrado actividades que se pueden relacionar con los usos mencionados. Por ejemplo: Acebey et al. (2010) mostraron la actividad anti-inflamatoria del α felandreno. Torres et al., (2018) revelaron la actividad anti-inflamatoria del α -pineno. Torres et al., (2018), estudiaron la actividad del α pineno como broncodilatador. Bernal et al., (2011), estudiaron el α -pineno como posible coadyuvante a las habilidades cognitivas de la memoria.

4.1.5. Determinación de la actividad microbiológica de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

El valor medicinal de las plantas curativas procede de sustancias químicas o principios activos que se localizan en el tejido de la planta, los cuales producen diferentes efectos fisiológicos. La mayoría de estos principios activos son

sumamente complejos y desconocidos. Dentro de dichos principios activos encontramos: aceites esenciales o esencias, alcaloides, glucósidos, terpenos, goma o resinas, aceites grasos y sustancias antibióticas (Ríos et al., 2007).

En la actualidad las enfermedades infecciosas constituyen uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, sumado a esto los problemas de resistencia bacteriana a los antibióticos, ya que la población los utiliza indiscriminadamente y no toma conciencia de las afecciones y complicaciones que puede causar el uso inadecuado de la antibioticoterapia. Todo esto hace posible a los microorganismos, crear mecanismos de resistencia que les permiten burlar a los antimicrobianos comunes y así seguir colonizando e infectando los tejidos humanos y animales (Ríos et al., 2007).

Es por ello que diariamente se buscan nuevas alternativas y se investigan aquellos factores que permitan inhibir el crecimiento bacteriano y disminuir los problemas de resistencia; estas nuevas alternativas proponen el uso de sustancias de origen vegetal, ya que desde la antigüedad nuestros antepasados han usado plantas medicinales y ha sido posible demostrar que extractos y aceites esenciales de plantas contienen compuestos que son capaces de matar microorganismos o inhibir su crecimiento (Berdonces, 1995).

Bermúdez et al., (2005), se refieren a la importancia de la valoración microbiológica de los compuestos extraídos de vegetales, que al ser analizados permiten comprobar su actividad biológica y que pueden ser empleados con fines terapéuticos y medicinales. Por tal razón se propuso estudiar la actividad antimicrobiana de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), frente a microorganismos como:

1. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) (Gram positiva).
2. *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) (Gram positiva).
3. *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) (Gram negativa).
4. *Escherichia coli* (ATCC 25922) (Gram negativa).
5. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (Gram negativa).

Las muestras evaluadas fueron el aceite esencial, extracto acuoso y etanólico, así como los productos obtenidos del scrining fitoquímico de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia):

1. Muestra 1: Aceite esencial: 100000 ppm
2. Muestra 2: Extracto acuoso: 50.000 ppm
3. Muestra 3: Extracto etanólico: 50000 ppm
4. Muestra 4: C1 F 1 Hexano: ETOAC 80:20 (10000ppm)
5. Muestra 5: C2 F3 líquido puro: 10000ppm
6. Muestra 6: C2F8: 15000ppm
7. Muestra 7: C3F1 (cristales): 10.000ppm
8. Muestra 8: C2, F (8,9), Hex: ETOAC 80:20: 5000 ppm
9. Muestra 9: C2 F9: 5000 ppm
10. Muestra 10: C1F (24 - 27), Compuesto Sólido: 5000 ppm

Los resultados alcanzados de la evaluación microbiológica se exponen a continuación:

Cuadro 26: Actividad antimicrobiana de los extractos y sus fracciones de Tarqui (*Hedyosmum lutey nii* Todzia), frente a distintos microorganismos

BACTERIAS	Halos de inhibición en mm																													Control Positivo	Control Negativo	
	1			2			3			4			5			6			7			8			9			10				
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2			R3
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	16	15	12	11	11	11	12	11	0	0	0	15	14	15	21	20	20	16	15	16	16	17	17	15	14	15	0	0	0	17	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	15	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0
<i>Escherichia coli</i>	16	17	16	11	12	12	16	15	15	14	13	13	0	0	0	27	26	27	19	18	19	25	25	26	23	23	24	9	8	9	24	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	11	12	0	0	0	0	0	0	11	10	10	0	0	0	0	0	0	11	10	11	10	10	10	11	12	12	0	0	0	24	0

Interpretación: 1: Aceite esencial 100000 ppm; 2: Extracto acuoso 50.000 ppm; 3: Extracto etanólico 50000 ppm; 4: C1 F1 Hexano: ETOAC 80:20 (10000 ppm); 5: C2F3 líquido puro 10000 ppm; 6: C2F8 15000ppm; 7: C3 F1 (cristales) 10.000ppm; 8: C2 F(8, 9) HexETOAC 80:20 5000 ppm; 9: C2F9 5000 ppm; 10: C1F(24 a 27) 5000 ppm. CP: control positivo: Amikacina 30 µg para *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y para *Staphylococcus aureus* Erytromicina 15 µg. CN: control negativo: Dimetil Sulfóxido (DMSO).

Fuente: Resultados del análisis microbiológico por Torres, S., 2017

El uso tradicional de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), indica su posible utilización como agente antimicrobiano. Por tanto, el aceite y los extractos son activos contra bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*).

Todas las muestras ensayadas contra *Staphylococcus aureus*, fueron activas excepto la muestra 4 y 10; mientras que para *Escherichia coli*, fueron activas todas, excepto la muestra 5. Sin embargo, para *Pseudomonas aeruginosa* de todas las muestras probadas solo fueron activas las muestras 1, 4, 7, 8 y 9.

El estudio de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), mostro acción frente a bacterias gram-negativas de la familia Enterobacteriaceae: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. También, mostraron actividad contra las bacterias Gram positiva *Staphylococcus aureus* (Zaruma e Illescas, 2014).

Los resultados obtenidos son muy concordantes a los establecidos en la investigación producida por Nantitanon, Chowwanapoonpohn & Okonogi en el año 2007, en Tailandia, Taiwo, Ekundayo & Adeniyi, 1999 en Nigeria e Iwalokun, Hodonu, Aina & Agomo (2012), con la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Tarqui contra cepas de *Escherichia coli*. Sin embargo, los resultados son diferentes al analizar la biactividad frente a bacterias gram-positivas como la *Staphylococcus aureus* (Fun & Svendsen, 1990), con la propiedad de inhibir el crecimiento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* (Taiwo, et al, 1999).

La actividad antimicrobiana determinada en el aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), procedente del Bosque natural del ecosistema Jacarón ubicado en la parroquia Juan de Velasco, cantón Colta, provincia de Chimborazo, Ecuador, puede atribuirse a las estructuras químicas de los metabolitos secundarios encontrados en esta especie y a la metodología empleada para la determinación de la actividad antimicrobiana.

El aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) presentó actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (Iwalokun et al., 2012). Los componentes del aceite esencial de Tarqui mostraron actividad frente a impedir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, mediante el registro de un halo de inhibición medio de 15 milímetros. Sin embargo, este no mostro actividad contra *Enterococcus faecalis*.

Por otra parte, la inhibición de su crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Gram positivas) por el aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), podría explicarse que es a causa de un proceso sinérgico de los componentes que inhiben la formación del péptido-glucano que es constituyente fundamental de la pared celular de los microorganismos (Cervantes, García y Salazar, 2014).

Según datos emitidos sobre la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de las hojas y tallos de *P. acuminata*, tomada de la región cafetera de Colombia, utilizada en una concentración de 1 mg/mL inhibio el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y no presentó actividad contra bacterias gram-negativas ensayadas frente a “*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*” (Blandon, Santos, Feitosa, Goulart y Mosquera, 2014).

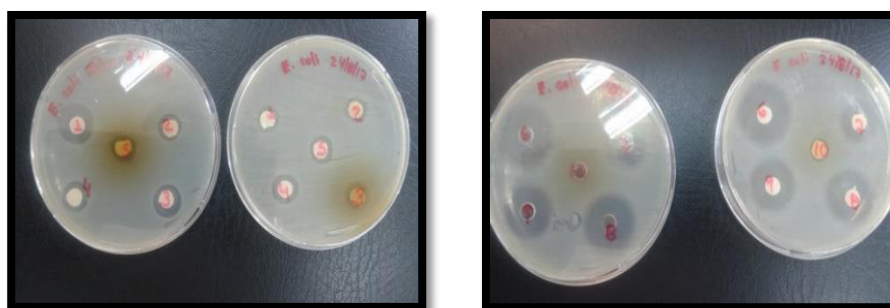


Figura 38: Actividad antibacteriana del aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) en *Escherichia coli* ATCC: 25922.

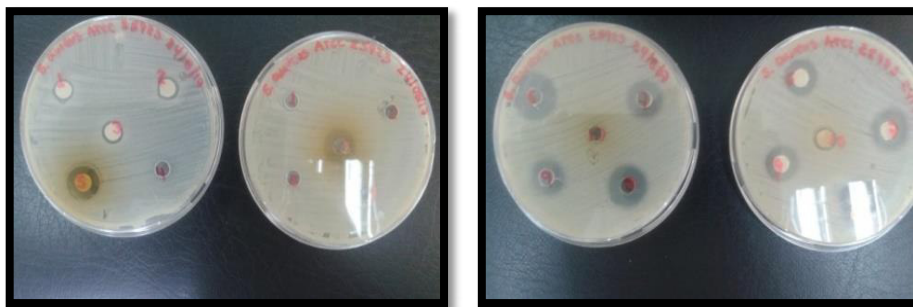


Figura 39: Actividad antibacteriana del aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) en *Staphylococcus aureus* ATCC: 25922.

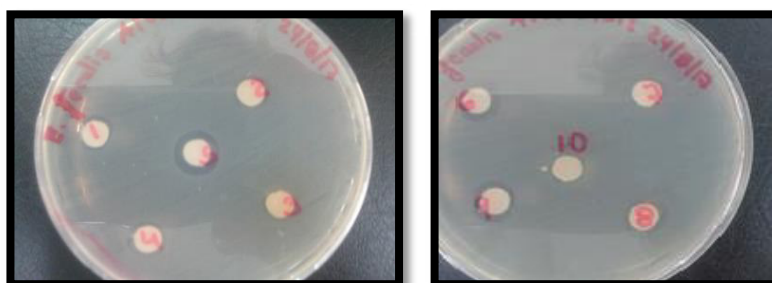


Figura 40: Actividad antibacteriana del aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) en *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.



Figura 41: Actividad antibacteriana del aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) en *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

4.1.5.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del aceite de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

Se realizó el estudio de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) sólo a las bacterias que fueron sensibles a la máxima concentración estudiada del aceite de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) que fue de 100000 ppm.

Cuadro 27: Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Microorganismos	Halos de inhibición (mm)													CIM	CP	CN
	Concentración estudiada (ppm)															
	100000			50000			25000			12500			6250			
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1			
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25922) (Gram positiva)	15	16	15	14	13	14	12	12	11	0	0	0	0	25000	17	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031) (Gram negativa)	15	15	16	13	12	13	12	11	12	10	11	10	0	12500	24	0
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) (Gram negativa)	13	12	13	12	12	13	11	12	12	9	10	9	0	12500	24	0

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) (Gram negativa)	12	11	12	11	10	12	10	11	11	0	0	0	0	25000	24	0
---------------------------------------------------------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	---	---	---	---	-------	----	---

Interpretación: CP: control positivo: Amikacina 30 µg para *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y para *Staphylococcus aureus* Erytromicina 15 µg. CN: control negativo: Dimetil Sulfóxido (DMSO).

Fuente. Resultados del análisis microbiológico por Torres, S., 2017

El aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), presentó un amplio espectro de actividad antimicrobiana frente a bacterias gram-positivas como gram-negativas, siendo mayor para las gram-negativas que para las gram-positivas. Por ello la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, alcanzó una concentración de 25000 ppm, en cambio que para la *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, se presentó a 12500 ppm respectivamente.

4.1.6. Pruebas in vivo

Los efectos bioquímicos, absorción y distribución con el uso terapéutico del extracto de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) y su interacción en los modelos de roedores se presentan en el Cuadro siguiente. Además, se pueden apreciar los valores medios y error estándar de los bio-indicadores de la química sanguínea el día 0 y una vez transcurrido 15 días de tratamiento con el extracto acuoso

de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia). También, se muestran los resultados logrados cuando se compararon los valores medios de cada grupo con el de control en el día 0, así como en el día 15.

Cuadro 28: Valores de los bio-indicadores de la química sanguínea el día 0 y una vez transcurrido 15 días con diferentes dosis del extracto acuoso de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Parámetros	Día	Control			Dosis baja (1250 mg/Kg)			Dosis media (2500 mg/Kg)			Dosis alta (5000 mg/Kg)		
		Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4	Ratón 5	Ratón 6	Ratón 7	Ratón 8	Ratón 9	Ratón 10	Ratón 11	Ratón 12
Ácido úrico (mg/dL)	0	0,27	0,32	0,45	0,3	0,5	0,65	0,48	0,5	0,6	0,37	0,54	0,6
	15	0,65	0,86	0,92	1,19	0,82	0,92	1,36	1,2	1,1	1,3	1,53	1,65
Albumina (2,9-5,9 g/dL)	0	3,2	3,5	3,3	2,9	3,1	3,3	2,8	3,5	3,7	3	3,1	3,6
	15	4,1	3,9	4	4,2	3,9	3,7	4,3	4,6	4,8	4,5	5,1	5,6
Colesterol (20-100 mg/dL)	0	70	75	80	80,3	78,6	82,4	72,4	82,5	79,6	90,1	89,5	86,3
	15	80,5	83,3	85,6	99,9	85,4	85,6	86,6	94	86	89,5	86	76,4
Creatinina (0,4-1,4 mg/dL)	0	0,6	0,65	0,7	0,5	0,6	0,56	0,5	0,5	0,6	0,4	0,46	0,53
	15	1	1,1	1,2	0,8	1,2	1,3	0,9	1,2	1,1	1,1	1,3	1,2
	0	5,7	6,2	6,3	5,4	5,3	5,4	6	5,4	5,6	5,9	6,1	6,2

Proteínas totales (4,5- 8,4 g/dL)	15	6,5	7,3	7,8	7,9	6,7	6,8	8,3	7,2	7,4	8,3	8,1	8,7
ALAT	0	48	52	55	54	58	62	58	45	52	45	56	52
(52-224 U/L)	15	54	62	64	68	67	69	62	65	68	52	64	69
ASAT	0	102	105	105	122	115	112	120	115	113	118	123	115
(U/L)	15	106	110	114	141	128	135	128	125	134	126	136	128
Fosfatasa Aleanina	0	136	125	138	103	114	121	119	125	123	121	132	126
(U/L)	15	156	134	145	144	132	143	136	138	133	134	145	139
Gamma GT	0	2.1	2.3	2.4	2.3	1.85	2.1	1.8	2.1	2.3	1.9	1.65	1.78
(U/L	15	2,4	2,8	2,7	2,5	2,3	2,5	2,6	2,8	3,1	2,8	2,68	3,2

Fuente. Resultados de laboratorio del análisis de sangre de ratones por Torres, S., 2017

Se puede apreciar que los valores medios de los bio-indicadores de la química sanguínea correspondientes a colesterol, creatinina, proteína, la enzima glutamato piruvato transaminasa GPT (ALAT), fosfatasa y gamma *no* exhibieron diferencias estadísticas el día 15 cuando se compararon con el control. Sin embargo, el ácido úrico, albumina y la enzima glutamato-oxalacetato transaminasa GOT (ASAT) *si* exhibieron diferencias estadísticas el día 15 cuando se comparan con el control. En el tema particular del ácido úrico y la albumina las diferencias fueron notables en el grupo con alta dosis del extracto acuoso de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia). Los valores altos de ácido úrico se pueden deber a una dieta rica en purinas, pues el organismo produce ácido úrico cuando metaboliza las purinas, un compuesto con nitrógeno que se forma en las células del cuerpo. La albumina es una proteína producida

por el hígado y sus valores altos por lo general no tienen importancia clínica y por lo tanto no son preocupantes. Valores altos se deben a deshidratación, dieta rica en proteínas, medicamentos, esteroides anabolizantes, entre otras causas.

Cuadro 29: Valores de los bio- indicadores biológicos de células sanguíneas el día 0 y una vez transcurrido 15 días con diferentes dosis del extracto acuoso de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Parámetros	Día	Control			Dosis baja (1250 mg/Kg)			Dosis media (2500 mg/Kg)			Dosis alta (5000 mg/Kg)		
		Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4	Ratón 5	Ratón 6	Ratón 7	Ratón 8	Ratón 9	Ratón 10	Ratón 11	Ratón 12
Hemoglobina(10,8-18,5 g/dL)	0	18,3	18,2	18,4	18	18,4	18,1	18,3	17,6	18,4	18,1	18,2	17,8
	15	18,4	18,4	18,6	18,1	19,1	19,3	19,2	18,8	19	19,5	19,4	18,5
Hematocrito (35-51 %)	0	45,3	42,3	45,5	48,8	46,5	44,2	47,6	43,9	46,7	48,5	46,9	47,6
	15	47,5	44,6	47,3	49,6	47,1	43,8	48,2	45,9	47,3	51,5	47,6	48,8
Leucocitos (6,4-26,2 x 103/mm3)	0	7,1	6,54	7,32	6,75	6,96	7,32	7,23	7,24	7,13	7,07	7,25	6,89
	15	7,46	6,71	7,42	6,81	7,1	7,45	6,75	7,42	7,93	6,94	7,89	7,68
Eritrocitos (7-10 x 106/mm3)	0	7,72	7,65	7,69	8,45	7,79	8,02	8,01	8,34	8,69	8,79	8,03	7,85
	15	8,14	8,15	8,32	8,98	8,56	8,74	8,52	8,98	9,12	8,61	8,86	8,76
Plaquetas (190-1000 x 103/mm3)	0	661	667	774	772	698	746	614	765	712	667	759	713
	15	674	674	786	782	734	789	745	794	792	691	812	805

Fuente. Resultados de laboratorio del análisis de sangre de ratones por Torres, S., 2017

Se puede observar que los valores del bio-indicador ASAT en los grupos que recibieron tratamiento con el extracto acuoso de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) fueron significativamente diferentes al valor que exhibió el grupo de control el día 15.

Sin embargo, comparando los valores de las enzimas glutamato piruvato transaminasa GPT (ALAT) y glutamato-oxalacetato transaminasa GOT (ASAT) el día 0 y el día 15, se observa que en general los valores ASAT de todos los grupos son mayores a los valores ALAT de todos los grupos, tanto el día 0 como el día 15. Este resultado sugiere la persistencia de una inflamación hepática, que es independiente del tratamiento con el extracto acuoso de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia). No obstante, hay que tener presente que la ingesta de medicamentos puede originar que ocurran valores enzimáticos moderadamente elevados.

En el siguiente Cuadro, se puede apreciar los valores medios y error estándar de los bio-indicadores de biología sanguínea el día 0 y una vez transcurrido 15 días de tratamiento con el extracto acuoso de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia). También, se muestra los resultados logrados cuando se compararon los valores medios de cada grupo con el grupo control en el día 0, así como en el día 15.

Cuadro 30: Valores medios y error estándar de bio-indicadores de química sanguínea de ratones modelo

	Ácido Úrico			Albumina			Colesterol		
	D0		D15	D0		D15	D0		D15
CTR	0,34	± 0,81	±	3,33	± 4,00	±	75,00	± 83,13	±
	0,09a		0,14a	0,15a		0,10a	5,0a		2,55a
DB	0,48	± 0,97	±	3,93	± 3,93	±	80,43	± 90,30	±
	0,17a		0,19a	0,20a		0,25a	1,9ab		8,31a
DM	0,52	± 1,22	±	3,33	± 4,56	±	78,17	± 88,87	±
	0,06a		0,13ab	0,47a		0,25ab	5,2a		4,46a

DA	0,50 ± 0,11a	1,49 ± 0,17b	±	3,23 ± 0,32a	±	5,06 ± 0,55b	±	88,63 ± 2,0b	±	83,97 ± 6,78a
Creatinina		Proteína		ALAT						
	D0	D15		D0	D15		D0	D15		
CTR	0,65 ± 0,05a	1,10 ± 0,10a	±	6,06 ± 0,32a	7,20 ± 0,65a	±	51,67 ± 3,51a	60,00 ± 5,29a	±	
DB	0,55 ± 0,05ab	1,10 ± 0,27a	±	5,36 ± 0,05b	7,13 ± 0,66a	±	58,00 ± 4,00a	68,00 ± 1,00a	±	
DM	0,53 ± 0,06ab	1,06 ± 0,15a	±	5,66 ± 0,30ab	7,63 ± 0,58a	±	51,67 ± 6,51a	65,00 ± 3,00a	±	
DA	0,46 ± 0,07b	1,20 ± 0,10a	±	6,06 ± 0,15a	8,36 ± 0,30a	±	51,00 ± 5,57a	61,67 ± 8,74a	±	
ASAT		Fosfatasa		Gamma						
	D0	D15		D0	D15		D0	D15		
CTR	10,00 ± 1,73a	11,00 ± 4,00a	±	13,00 ± 7,00a	14,00 ± 11,00a	±	2,63 ± 0,21a	2,266 ± 0,15a	±	
DB	11,33 ± 5,13b	13,67 ± 6,51b	±	11,67 ± 9,07b	13,67 ± 6,66a	±	2,43 ± 0,12a	2,083 ± 0,23a	±	
DM	11,00 ± 3,61b	12,00 ± 4,58b	±	12,33 ± 3,06ab	13,33 ± 2,52a	±	2,83 ± 0,25a	2,067 ± 0,25a	±	
DA	11,67 ± 4,01b	13,00 ± 5,29b	±	12,33 ± 5,51ab	13,67 ± 5,51a	±	2,89 ± 0,27a	1,776 ± 0,13a	±	

Fuente. Resultados de laboratorio del análisis de sangre de ratones por Torres, S., 2017

Los valores medios de los bio-indicadores biológicos no exhibieron diferencias estadísticas significativas el día 0 y el día 15. Con la excepción del valor medio de Eritrocitos (glóbulos rojos) el día 15, el cual resultó estadísticamente diferente cuando se compararon todos los grupos que recibieron el tratamiento con el grupo control. Estos resultados sugieren que el extracto de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), administrado de manera oral no tiene efectos apreciables en los bio-indicadores de biología sanguínea. Por esta razón, los resultados permiten concluir que no existe efecto tóxico en el conteo de los bio-indicadores de biología sanguínea.

Cuadro 31: Valores medios y error estándar de bio-indicadores biológicos de células sanguíneas

	Hemoglobina				Hematocritos				Leucocitos			
	D0		D15		D0		D15		D0		D15	
CTR	18,30	±	18,46	±	44,37	±	46,46		6,98	±	7,19	
	0,10a		0,12a		1,79a		±1,62a		0.40a		0.42a	
DB	18,16	±	18,83	±	46,50	±	46,83		7,01		7,12	±
	0,21a		0,64a		2,30a		±2,91a		0.29a		7,12a	
DM	18,10	±	19,00	±	46,07	±	47,13		7,20		7,36	±
	0,44a		0,20a		1,93a		±1,16a		0.06a		0,59a	
DA	18,03	±	19,13	±	47,66	±	49,30		7,07		7,50	±
	0,21a		0,55a		0,80a		±2,00a		0.18a		0,50a	
	Eritrocitos				Plaquetas							
	D0		D15		D0		D15					
CTR	7,68	±	8,20	±	700,7	±	71,3	±				
	0,04a		0,10a		63,6a		64,7a					
DB	8,08	±	8,76	±	738,7	±	76,3	±				
	0,34a		0,21b		37,5a		29,9a					
DM	8,34	±	8,87	±	697,0	±	77,0	±				
	0,34a		0,31b		76,6a		27,7a					
DA	8,22	±	8,74	±	713,0	±	76,3	±				
	0,50a		0,13b		46,0a		67,9a					

Fuente. Resultados de laboratorio del análisis de sangre de ratones por Torres, S., 2017

Cuadro 32: Valores medios y error estándar de bio-indicadores biológicos de células sanguíneas

	Hemoglobina				Hematocritos				Leucocitos			
	D0		D15		D0		D15		D0		D15	
CTR	18,30	± 0,10a	18,46	± 0,12a	44,37	± 1,79a	46,46	± 1,62a	6,98	± 0,40a	7,19	± 0,42a
DB	18,16	± 0,21a	18,83	± 0,64a	46,50	± 2,30a	46,83	± 2,91a	7,01	± 0,29a	7,12	± 7,12a
DM	18,10	± 0,44a	19,00	± 0,20a	46,07	± 1,93a	47,13	± 1,16a	7,20	± 0,06a	7,36	± 0,59a
DA	18,03	± 0,21a	19,13	± 0,55a	47,66	± 0,80a	49,30	± 2,00a	7,07	± 0,18a	7,50	± 0,50a

	Eritrocitos			Plaquetas		
	D0	D15		D0	D15	
CTR	7,68	± 8,20	±	700,7	± 711,3	±
	0,04a	0,10a		63,6a	64,7a	
DB	8,08	± 8,76	±	738,7	± 768,3	±
	0,34a	0,21b		37,5a	29,9a	
DM	8,34	± 8,87	±	697,0	± 777,0	±
	0,34a	0,31b		76,6a	27,7a	
DA	8,22	± 8,74	±	713,0	± 769,3	±
	0,50a	0,13b		46,0a	67,9a	

Fuente. Resultados de laboratorio del análisis de sangre de ratones por Torres, S., 2017

4.2. Pruebas de hipótesis

4.2.1. Hipótesis para el cumplimiento del objetivo 1

Se aplicó un diseño factorial completamente aleatorizado con 2 réplicas, con la finalidad de comprobar la hipótesis planteada en ésta investigación, referente a la selección de la hoja de Tarqui que al ser analizada permita determinar la mayor presencia de los principios activos.

4.2.1.1. Población.

La población estuvo conformada por los posibles datos generados por el análisis respecto de porcentaje de grasa y proteína.

4.2.1.2. Muestra.

La muestra fue tomada de forma no aleatoria, constituyéndose sus unidades experimentales en los grupos de hojas de 2 kilogramos de diferente madurez y de diferente piso altitudinal del bosque de Jacarón.

4.2.1.3. Hipótesis.

¿Cuál es el tipo de hoja en base a su grado de madurez y del piso altitudinal del bosque de Jacarón, que permita evidenciar la mayor presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios?

Hipótesis nula: todos los tipos de hojas de los tres pisos altitudinales de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) del bosque de Jacarón contienen la misma cantidad de metabolitos secundarios.

Hipótesis alternativa: existe al menos un tipo de hoja de los tres pisos altitudinales de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) del bosque de Jacarón que difiere significativamente en la cantidad de metabolitos secundarios de los otros tipos de hojas.

4.2.1.4. Análisis estadístico de los datos para porcentaje de grasa.

1. Análisis de residuales

En el modelo de análisis de varianza los supuestos del modelo deben comprobarse antes de validar las conclusiones de la etapa de interpretación. “La tabla de ANOVA supone que los residuos se distribuyen normales, independientes y con varianza constante”. “La contradicción grave uno de

estos supuestos conduce a conclusiones erradas” (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

En la siguiente Figura se observará que para la variable de respuesta porcentaje de grasa, los 3 supuestos se cumplen, así que los datos y conclusiones obtenidas de la tabla Anova son confiables.

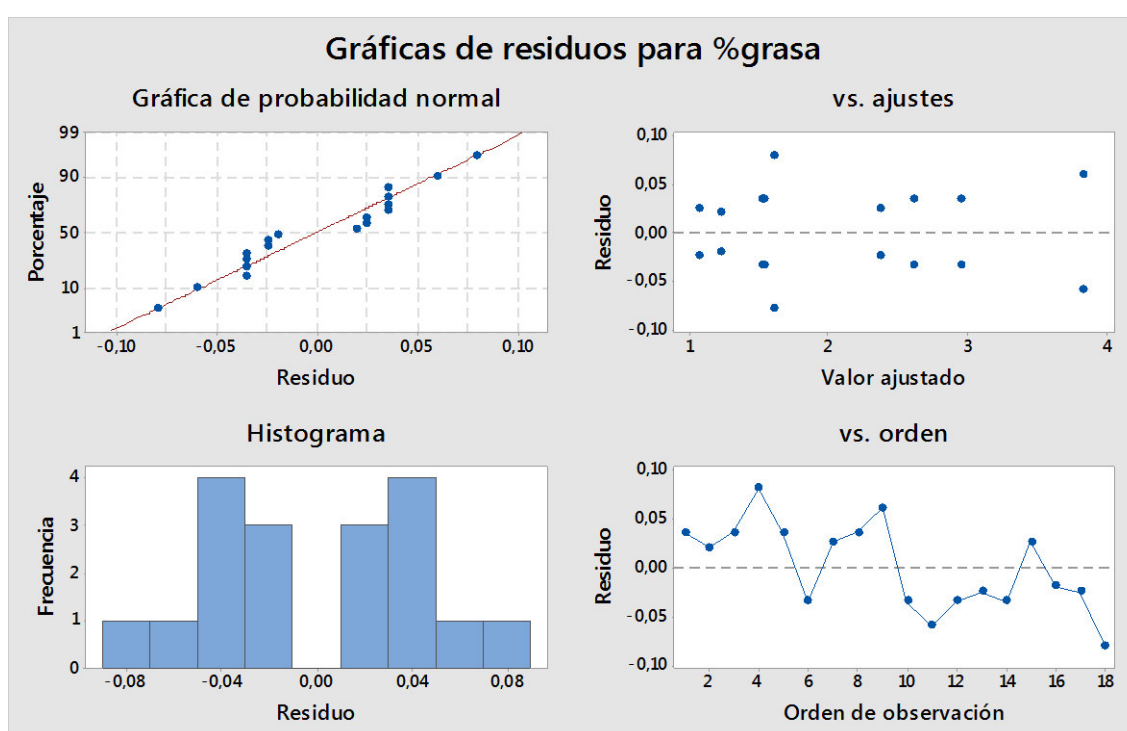


Figura 42: Residuales para porcentaje de grasa. Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

- Supuesto de normalidad.

En el primer gráfico se puede determinar que los datos siguen una distribución normal, puesto que están muy cercanos a la línea de tendencia. Para comprobar este supuesto se realizó una prueba formal de Ryan-Joiner, debido

a que hay menos de 30 valores. “Cuando el coeficiente de correlación se halla cercano a 1 hay probabilidad de que la población se considere normal” (Minitab, 2017). Considerar trabajar con las hipótesis:

H_0 = Los valores presentan una distribución normal

H_1 = Los valores no presentan una distribución normal

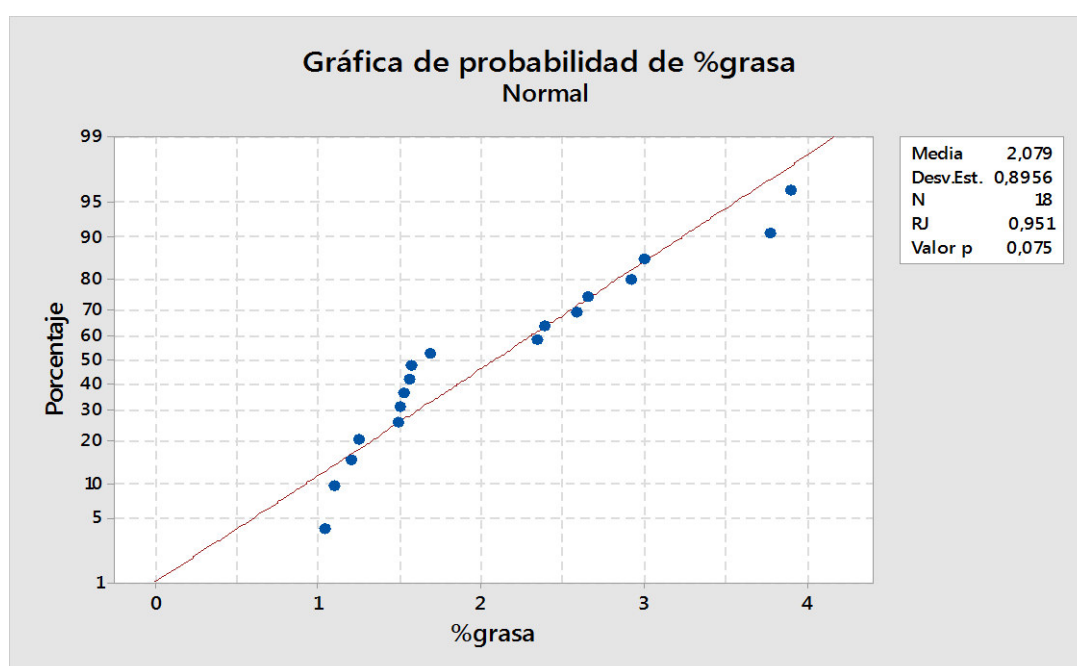


Figura 43: Prueba de normalidad para porcentaje de grasa. Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

Considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ y un p-value de $0,075 > \alpha$, la hipótesis nula no se rechaza, por lo que se concibe que los valores siguen una distribución normal.

- Supuesto de igualdad de varianzas

En la gráfica de residuos contra los valores ajustados se observa la formación de patrones y no es claro si se cumple el supuesto. Se decide realiza un prueba de Barlette, ya que los datos están normalmente distribuidos. “Una desviación de la normalidad pueden incidir en resultados erróneos, a pesar de esta condición esta prueba es normalmente más potente que la metodología de comparaciones múltiples o método de Levene” (Minitab, 2017).

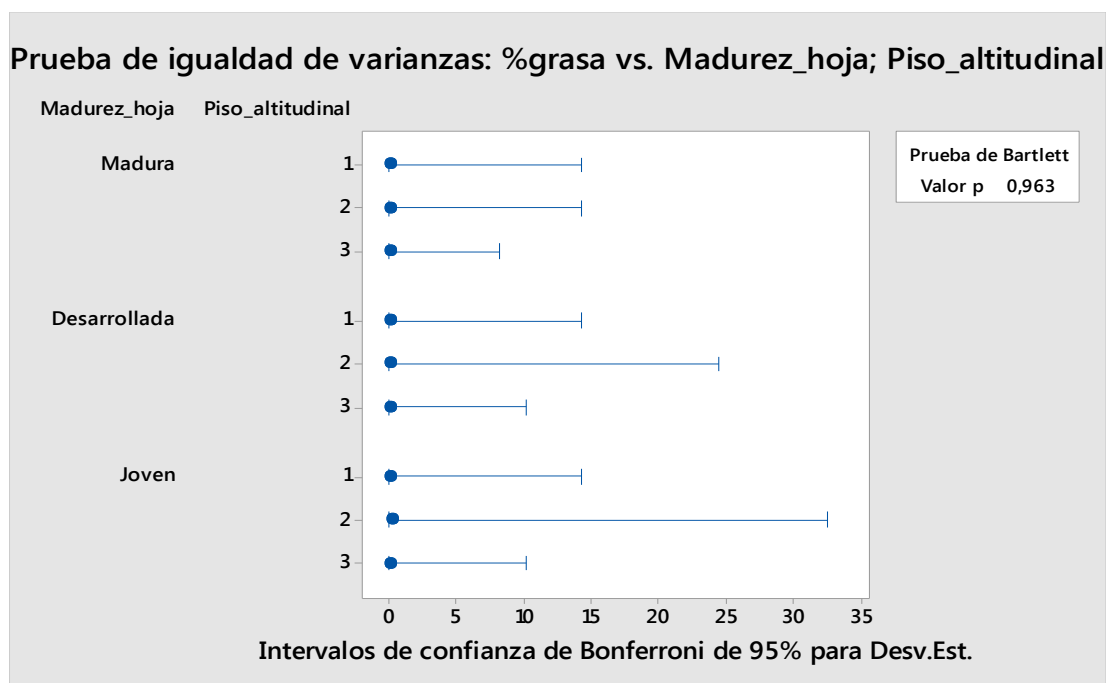


Figura 44: Prueba de igualdad de varianzas para el porcentaje de grasa.

Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

Método

Hipótesis nula	Todas las varianzas son iguales
Hipótesis alterna	Por lo menos una varianza es diferente

Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Fue empleado el método de Bartlett. Esta metodología es empleada solo para valores normales.

Pruebas

Método	Estadístico de prueba	Valor p
Bartlett	2,47	0,963

Se puede determinar que el valor p de 0,963 > α de 0,05, lo que permite concluir que las varianzas son iguales y por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula.

- Supuesto de independencia de los datos

En la gráfica de residuos contra el orden, no se ven patrones definidos, por lo que no se rechaza este supuesto y se concluye que los datos fueron tomados aleatoriamente. Para comprobar se realiza una prueba de corridas.

Prueba

Hipótesis nula H_0 : El orden de los valores es aleatorio

Hipótesis alterna H_1 : El orden de los valores no es aleatorio

Número de corridas

Observado	Esperado	Valor p
8	9,89	0,352

Se puede concluir que el valor p de 0,352 > α de 0,05, lo que conlleva a no rechazar la hipótesis nula, comprobándose que los valores fueron tomados en orden aleatorio.

- **Análisis de Varianza (Anova)**

Factor	Niveles	Valores
Piso_altitudinal	3	1; 2; 3
Madurez_hoja	3	Madura; Desarrollada; Joven

Cuadro 33: Análisis de Varianza para porcentaje de grasa

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	13,6017	1,70021	462,29	0,000
Lineal	4	12,3376	3,08440	838,66	0,000
Piso_altitudinal	2	4,9655	2,48277	675,07	0,000
Madurez_hoja	2	7,3720	3,68602	1002,24	0,000
Interacciones de 2 términos	4	1,2641	0,31602	85,93	0,000
Piso_altitudinal*Madurez_hoja	4	1,2641	0,31602	85,93	0,000
Error	9	0,0331	0,00368		
Total	17	13,6348			

Fuente. Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

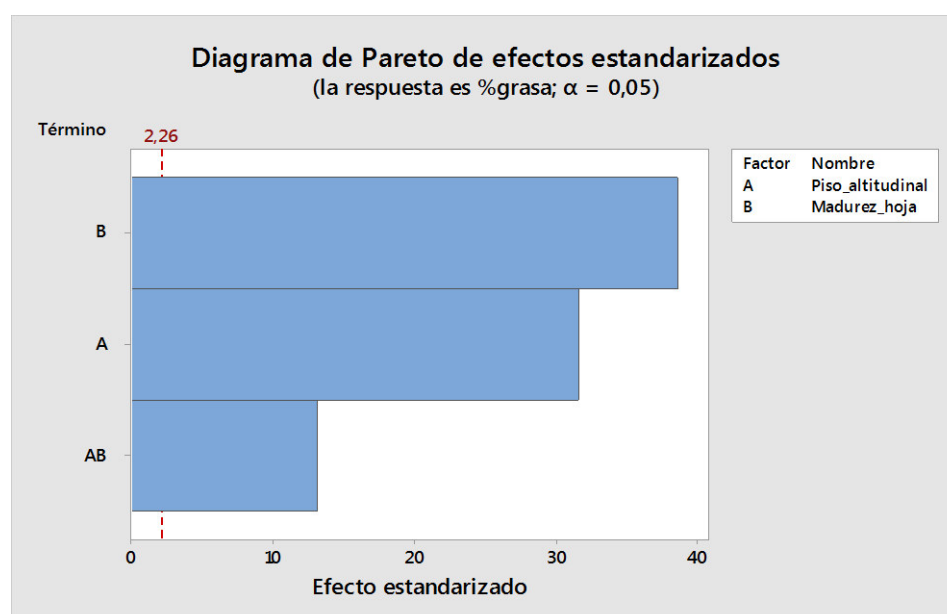


Figura 45: Diagrama Pareto de efectos estandarizados para porcentaje de grasa. *Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019*

Modelo:

Cuando el modelo es significativo, indica que al menos uno de los términos es significativo. Considerando un $\alpha = 0,05$ y un valor-p del modelo de 0,000, se considerará que hay significancia.

Interacción:

Con una probabilidad del 5% de cometer un error tipo I, se debe rechazar la hipótesis nula debido a que el valor de p (0,000) $< \alpha$ (0,05), concluyendo que la interacción entre el piso altitudinal y la madurez de la hoja es significativa.

Factores:

Debido a que hay interacción entre los factores, no sería necesario analizar individualmente cada factor, sin embargo se puede determinar que el factor Piso altitudinal y Madurez de la hoja son significativos, debido a que se rechaza la hipótesis nula con un valor-p de 0,000.

• Adecuación del modelo

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0606447	99,76%	99,54%	99,03%

Se puede considerar que es un excelente modelo debido a que el coeficiente de determinación es un valor alto, concluyendo que para probar el porcentaje de grasa de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), el modelo explica cerca del 99,76% de variabilidad de los resultados.

El valor de r^2 ajustado es elevado (99,54%), por lo que seguiría siendo un buen modelo si se ingresan más factores.

El valor de Pred r^2 es 99,03%, lo que indica que el modelo tendrá un excelente desempeño en la predicción de respuestas si se realiza un nuevo experimento.

- **Gráficas de interacción**

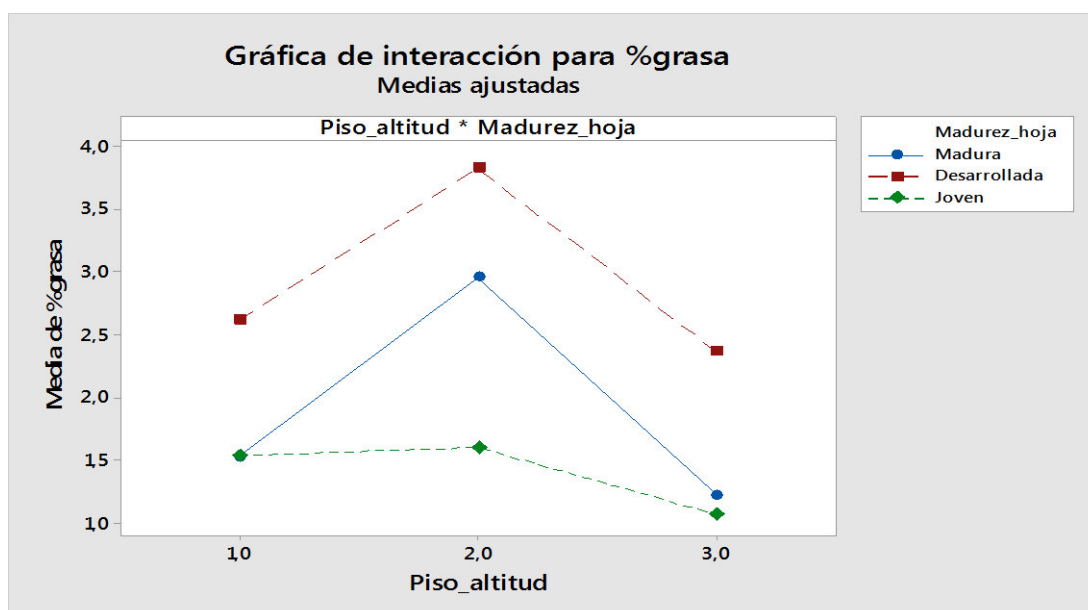


Figura 46: Interacción de factores para porcentaje de grasa. Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

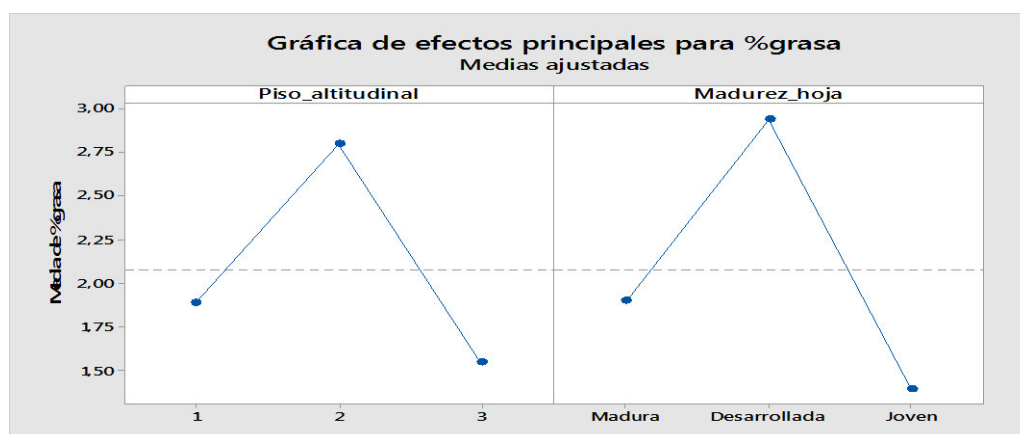


Figura 47: Efectos principales para porcentaje de grasa. Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

Las gráficas son un buen indicador para la interacción entre factores. Mediante la tabla de Anova, ya se pudo determinar cuáles son los factores que presentan interacción y mediante estos gráficos se podría determinar el nivel óptimo para conseguir el mayor porcentaje de grasa de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), así:

En el piso altitudinal, lo óptimo es usar el piso 2, con una altura de 3300 a 3400 msnm.

En la madurez de la hoja, lo óptima es usar la desarrollada.

4.2.1.5. Análisis estadístico de los datos para porcentaje de proteína.

1. Análisis de residuales

Para validar las conclusiones de la etapa de interpretación deben ser verificados los supuestos del modelo de análisis de la varianza. “Los residuos se distribuyen de manera normal, independientes y con varianza constante registradas en la tabla ANOVA. La contravención grave de uno de estos supuestos conduciría a establecer conclusiones erradas” (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

En la siguiente Figura se observará que para la variable de respuesta porcentaje de proteína, los 3 supuestos se cumplen, así que los datos y conclusiones obtenidas de la tabla Anova son confiables.

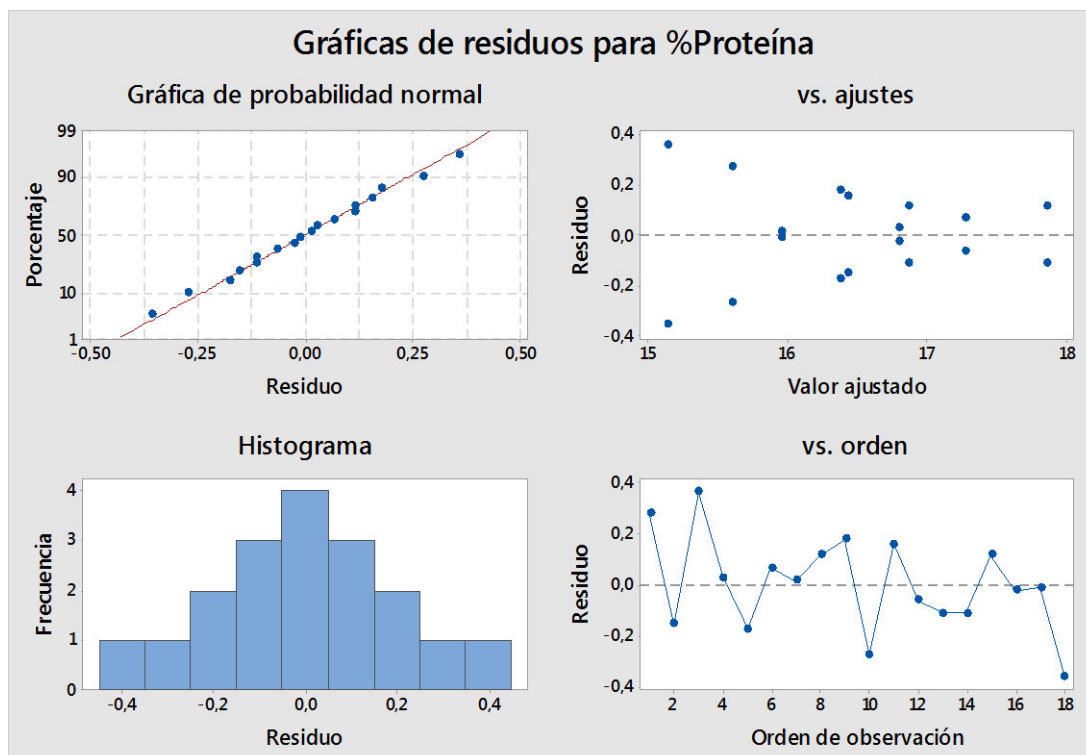


Figura 48: Residuales para porcentaje de proteína. Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

- **Supuesto de normalidad**

En el primer gráfico se puede determinar que los datos siguen una distribución normal, puesto que están muy cercanos a la línea de tendencia. Para comprobar este supuesto se realizó una prueba formal de Ryan-Joiner, debido a que hay menos de 30 valores. “Se considera con mayores probabilidades de ser una población normal cuando el coeficiente de correlación es cercano a 1” (Minitab, 2017). Se trabaja con las siguientes hipótesis:

H_0 : Los valores siguen una distribución normal

H_1 : Los valores no siguen una distribución normal

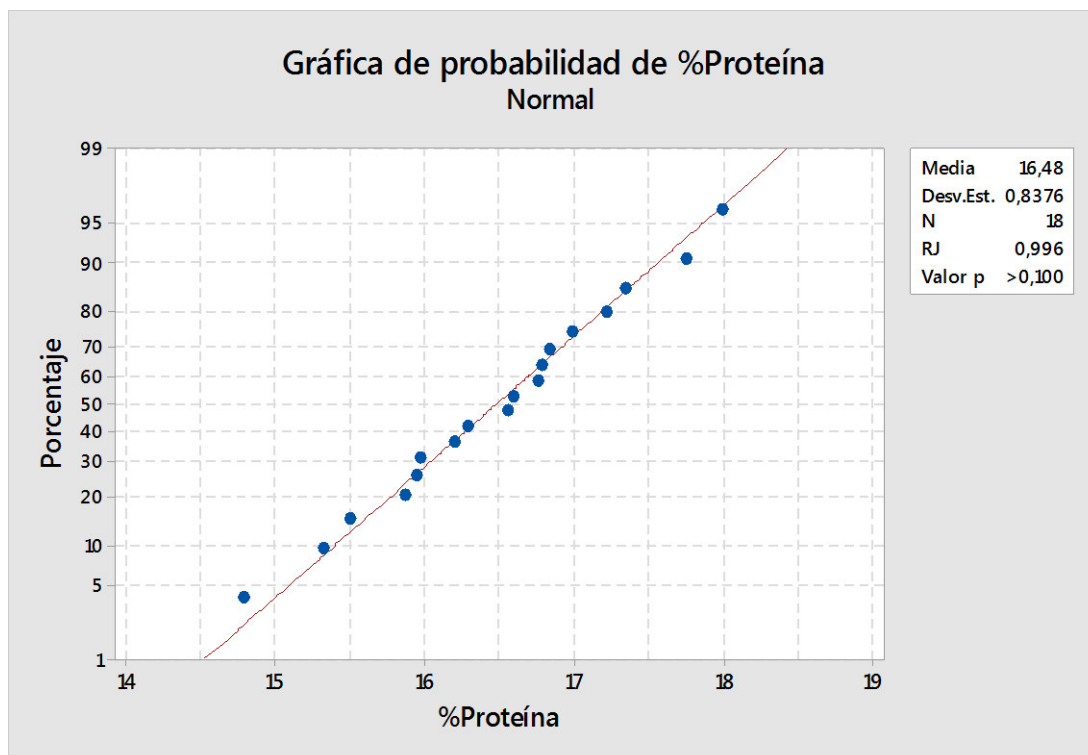


Figura 49: Prueba de normalidad para porcentaje de proteína. Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

Considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ y un p-value de $0,100 > \alpha$, considerando que los valores siguen una distribución normal, no se rechaza la hipótesis nula.

- Supuesto de igualdad de varianzas

En la gráfica de residuos contra los valores ajustados se observa la formación de patrones y no es claro si se cumple el supuesto. Se decide realizar una prueba de Barlette, ya que los datos están distribuidos normalmente. “Se podrán obtener resultados inexactos de las pruebas realizadas si existiera cualquier desviación de la normalidad. A pesar de esta consideración, esta valoración es mucho más fuerte que el método de comparaciones múltiples planteado por Levene” (Minitab, 2017).

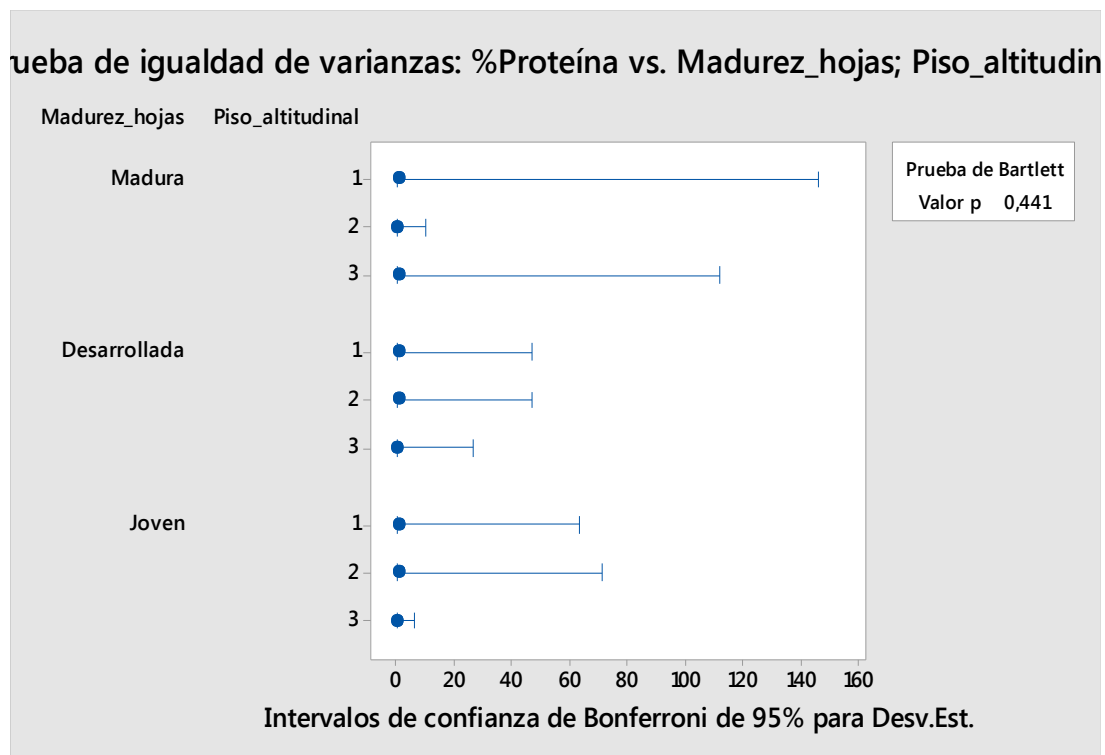


Figura 50: Prueba de igualdad de varianzas para porcentaje de proteína.
Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

Método

Hipótesis nula Todas las varianzas son iguales

Hipótesis alterna Por lo menos una varianza es diferente

Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se utiliza el método de Bartlett. Este método es exacto solo para valores normales

Pruebas

Método	Estadístico de prueba	Valor p
Bartlett	7,93	0,441

Se puede determinar que el valor p de 0,441 > α de 0,05, por lo que se concluye que las varianzas son iguales y por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula.

- Supuesto de independencia de los datos

En la gráfica de residuos contra el orden, no se ven patrones definidos, por lo que no se rechaza este supuesto y se concluye que los datos fueron tomados aleatoriamente. Para comprobar se realiza una prueba de corridas.

Prueba

Hipótesis nula H_0 = El orden de los valores es aleatorio

Hipótesis alterna H_1 = El orden de los valores no es aleatorio

Número de corridas

Observado	Esperado	Valor p
9	9,89	0,662

Se puede concluir que el valor p de 0,662 > α de 0,05, se comprueba que los valores fueron tomados en orden aleatorio, por lo que no se rechaza la hipótesis nula.

2. Análisis de Varianza (Anova)

Factor	Niveles	Valores
Piso_altitudinal	3	1; 2; 3
Madurez_hoja	3	Madura; Desarrollada; Joven

Cuadro 34: Análisis de Varianza para porcentaje de proteína

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	11,3432	1,41790	21,90	0,000
Lineal	4	9,7327	2,43317	37,57	0,000
Piso_altitudinal	2	2,6361	1,31807	20,35	0,000
Madurez_hojas	2	7,0965	3,54827	54,79	0,000
Interacciones de 2 términos	4	1,6105	0,40262	6,22	0,011
Piso_altitudinal*Madurez_hojas	4	1,6105	0,40262	6,22	0,011

Error	9	0,5828	0,06476
Total	17	11,9260	

Fuente. Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

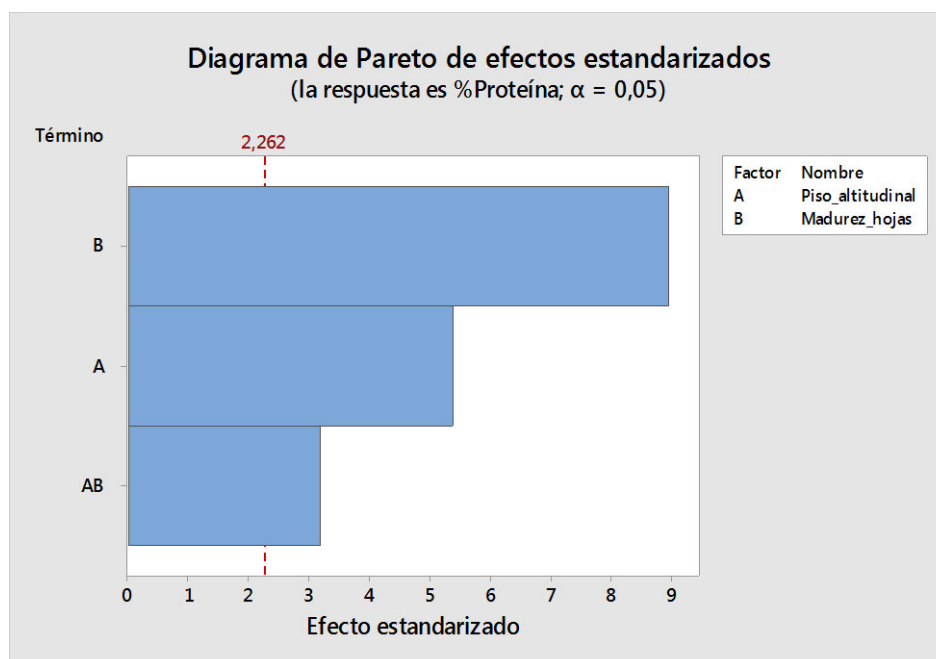


Figura 51: Diagrama Pareto de efectos estandarizados para porcentaje de proteína. *Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019*

Modelo:

Cuando el modelo es significativo, indica que al menos uno de los términos es significativo. Considerando un $\alpha = 0,05$ y un valor-p del modelo de 0,000, se considerará que hay significancia.

Interacción:

Con una probabilidad del 5% de cometer un error tipo I, siendo el valor p $(0,011) < \alpha (0,05)$, se rechaza la hipótesis nula, concluyendo que la interacción

entre el piso altitudinal y la madurez de la hoja es significativa para el porcentaje de proteína en las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

Factores:

Debido a que hay interacción entre los factores, no sería necesario analizar individualmente cada factor, sin embargo se puede determinar que el factor Piso altitudinal y Madurez de la hoja son significativos, debido a que con un valor $-p$ de 0,000, se rechaza la hipótesis nula.

3. Adecuación del modelo

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,254471	95,11%	90,77%	80,45%

Se puede considerar que es un excelente modelo debido a que el coeficiente de determinación es un valor alto, concluyendo que para probar el porcentaje de proteína de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), el modelo explica cerca del 95,11% de variabilidad de los resultados.

El valor de r^2 ajustado es alto (90,77%), por lo que seguiría siendo un buen modelo si se ingresan más factores.

El valor de Pred r^2 es 80,45%, lo que indica que el modelo tendrá un buen desempeño en la predicción de respuestas si se realiza un nuevo experimento.

- Gráficas de interacción

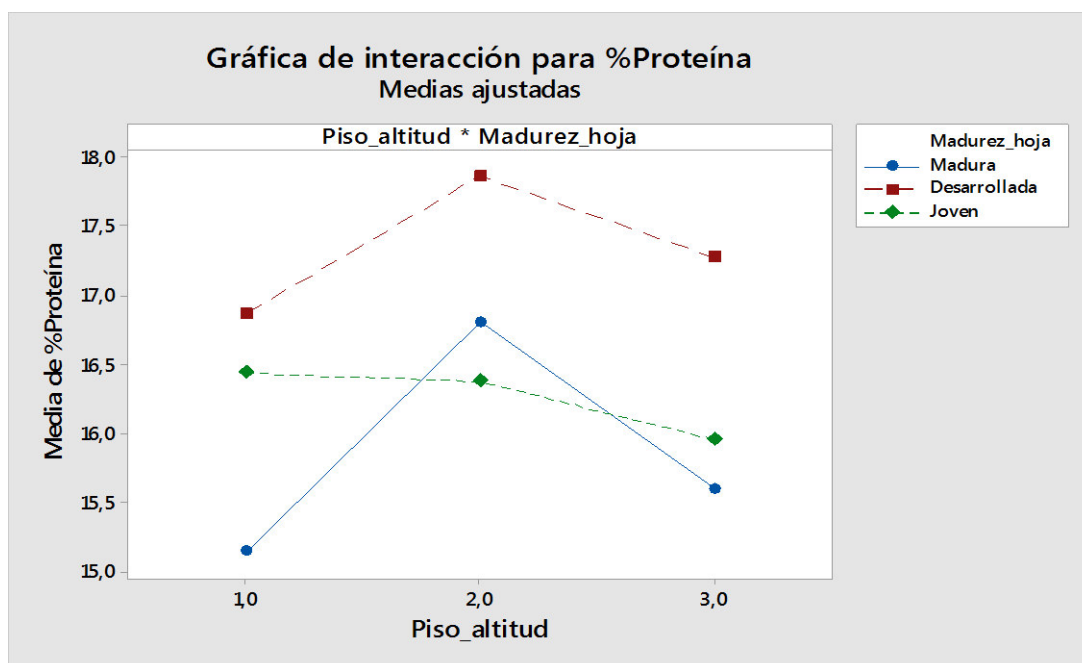


Figura 52: Interacción para porcentaje de proteína. Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

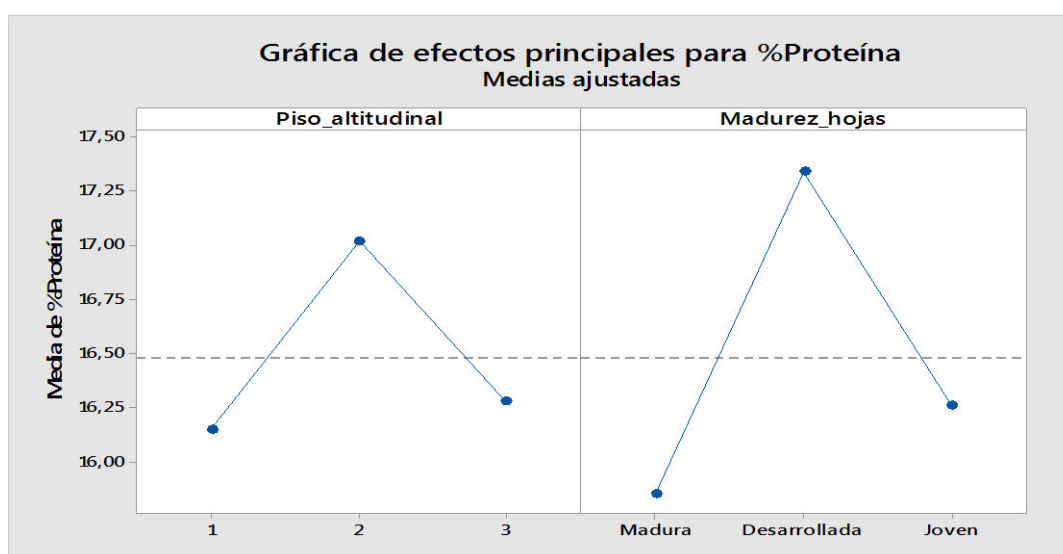


Figura 53: Efectos principales para el porcentaje de proteína. Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

Las gráficas son un buen indicador para la interacción entre factores. Mediante la tabla de Anova, ya se pudo determinar cuáles son los factores significativos para la variable de respuesta y mediante estos gráficos se podría determinar el nivel óptimo para conseguir el mayor porcentaje de grasa de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), así:

En el piso altitudinal, lo óptimo es usar el piso 2, con una altura de 3300 a 3400 msnm.

En la madurez de la hoja, lo óptima es usar la desarrollada.

4.2.2. Hipótesis para el cumplimiento del objetivo 2

Se obtuvieron los datos de 3 réplicas de la aplicación de 10 extractos fitoquímicos frente al crecimiento de 5 tipos de cepas de bacterias, de los cuales sólo se detectó actividad frente a 4 de ellas. Después se aplicó Anova de una vía con los datos obtenidos de la aplicación de los 10 extractos fitoquímicos frente a los 4 tipos de bacterias donde se observó actividad antibacteriana.

Esto se realizó con la finalidad de comprobar la hipótesis planteada referente a qué extracto fitoquímico de las hojas seleccionadas de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) cuyos grupos de metabolitos secundarios presentan la mayor actividad antimicrobiana.

4.2.2.1. Población.

Las unidades experimentales de la población fueron los posibles grupos de 5 kilogramos que se pudieron generar de la totalidad de hojas desarrolladas del piso altitudinal 2.

4.2.2.2. Muestra.

La muestra se tomó de manera no aleatoria, constituyéndose en sus unidades experimentales grupos de 5 kilogramos de hojas desarrolladas y tomadas del piso altitudinal 2 del bosque de Jacarón, debido a que mediante la aplicación del diseño experimental, se determinó que son las que presentan la mayor cantidad de grasa y proteína.

4.2.2.3. Hipótesis.

¿Cuál es el extracto fitoquímico obtenido de las hojas seleccionadas de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum Luteynii* Todzia), cuyos grupos de metabolitos secundarios presentan la mejor actividad antibacteriana?

Hipótesis nula: todos los extractos fitoquímicos extraídos de las hojas desarrolladas del piso altitudinal 2 de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) presentan igual grado de inhibición del crecimiento de 5 especies de bacterias.

Hipótesis alternativa: al menos uno de los extractos fitoquímicos extraídos de las hojas desarrolladas del piso altitudinal 2 de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) difiere significativamente en referencia al grado de inhibición del crecimiento de cinco cepas de bacterias.

4.2.2.4. ANOVA de una vía del grado de inhibición de los productos de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

Los siguientes análisis se realizan con 10 muestras, así:

Cuadro 35: Nombres de las muestras usadas para pruebas ANOVA de una vía

1	Aceite esencial 100000 ppm,
2	Extracto acuoso 50.000 ppm,
3	Extracto etanólico 50000 ppm,
4	C1 F1 Hexano: ETOAC 80:20 (10000 ppm),
5	C2F3 líquido puro 10000 ppm,
6	C2F8 15000ppm,
7	C3 F1 (cristales) 10.000ppm,
8	C2F(8, 9), Hex:ETOAC 80:20 8: 5000 ppm
9	C2F9 5000 ppm,
10	C1F(24 a 27) 5000 ppm

1. Staphylococcus aureus

Cuadro 36: Datos del grado de inhibición para Staphylococcus aureus

Grado_inhibición	Muestra
15	1
16	1
15	1
12	2
11	2
11	2
11	3
12	3
11	3
15	5
14	5
15	5
21	6
20	6
20	6
16	7
15	7
16	7
16	8
17	8
17	8
15	9
14	9
15	9

Cuadro 37: Anova de una vía para el grado de inhibición de *Staphylococcus aureus*

Grado_inhibición

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	176,667	7	25,238	75,714	0,000
Dentro de grupos	5,333	16	0,333		
Total	182,000	23			

Fuente. Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

$$H_o: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8 = \mu_9$$

H_a : al menos una de las medias es diferente

Con una probabilidad del 5% de cometer un error tipo I, se rechaza la hipótesis nula porque el valor p (0,000) < α (0,05), concluyendo que al menos una de las medias de las muestras presenta diferente grado de inhibición para *Staphylococcus aureus*.

Cuadro 38: Subconjuntos homogéneos para el grado de inhibición de *Staphylococcus aureus*

Grado_inhibición

HSD Tukey^a

Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Extracto acuoso	3	11,3333			
Extracto etanólico	3	11,3333			
C2F3	3		14,6667		
C2F9	3		14,6667		
Aceite esencial	3		15,3333	15,3333	
C3F1	3		15,6667	15,6667	
C2F(8,9) Hex:ETOAC	3			16,6667	
C2F8	3				20,3333
Sig.		1,000	,442	,155	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos

A.- Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000

Fuente. Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

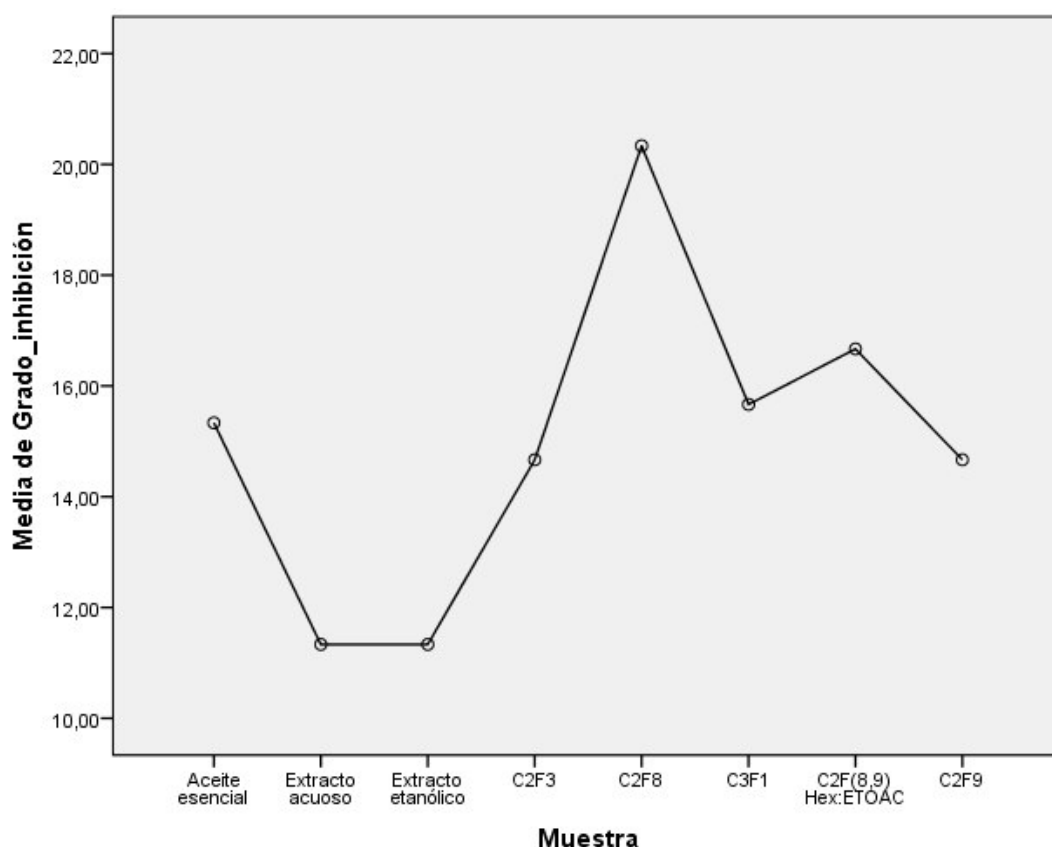


Figura 54: Medias para el grado de inhibición de *Staphylococcus aureus*.
Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

Luego de determinar que existen diferencias entre las medias, se realizó una prueba post hoc de Tukey para identificar subconjuntos homogéneos de medias que no se diferencian entre sí (Fallas, 2012). Se determinaron 4 subgrupos significativamente iguales, de ellos el de mayor promedio lo tiene el cuarto grupo perteneciente a la muestra C2F8, que significa columna cromatográfica 2, fracción 8.

Este compuesto es puro, de tipo aceitoso y es producto del aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en las hojas desarrolladas del piso altitudinal 2 de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) presente en el bosque de Jacarón. De este compuesto se pudo obtener una cantidad de 0.0151 gramos a partir de 2

kilogramos de hojas, debido a la dificultad de la extracción, aislamiento y purificación mediante procesos muy largos, minuciosos y uso de reactivos químicos especializados; por lo que no se puede trabajar con este compuesto, sino que se eligió el aceite esencial presente en el segundo grupo homogéneo, ya que es la muestra más accesible y de mayor grado de inhibición contra la bacteria *Staphylococcus aureus*.

2. *Klebsiella pneumoniae*

Cuadro 39: Datos del grado de inhibición para Klebsiella pneumoniae

Grado_inhibición	Muestra
15	1
15	1
16	1

Se observa que solo la muestra de aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) en una concentración de 100000 ppm muestra actividad sobre esta bacteria, por lo que se elige esta muestra para futuros análisis.

3. Escherichia coli

Cuadro 40: Datos del grado de inhibición para Escherichia coli

Grado_inhibición	Muestra
16	1
17	1
16	1
11	2
12	2
12	2
16	3
15	3
15	3
14	4
13	4
13	4
27	6
26	6
27	6
19	7
18	7
19	7
25	8
25	8
26	8
23	9
23	9
24	9
9	10
8	10
9	10

Cuadro 41: Anova de una vía para el grado de inhibición de Escherichia coli

Grado_inhibición

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	947,630	8	118,454	355,361	,000
Dentro de grupos	6,000	18	0,333		
Total	953,630	26			

Fuente. Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8 = \mu_9 = \mu_{10}$$

H_a : al menos una de las medias es diferente

Con una probabilidad del 5% de cometer un error tipo I, siendo el valor p (0,000) < α (0,05), se rechaza la hipótesis nula, concluyendo que al menos una de las medias de las muestras presenta diferente grado de inhibición para Escherichia coli.

Cuadro 42: Subconjuntos homogéneos para el grado de inhibición de Escherichia coli

Grado_inhibición

HSD Tukey^a

Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
C1F(24 a 27)	3	8,6667						
Extracto acuoso	3		11,6667					
C1F1	3			13,3333				
Extracto etanólico	3				15,3333			
Aceite esencial	3				16,3333			
C3F1	3					18,6667		
C2F9	3						23,3333	
C2F(8,9) Hex:ETOAC	3							25,3333
C2F8	3							26,6667
Sig.		1,000	1,000	1,000	,490	1,000	1,000	,174

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a.- Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000

Fuente. Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

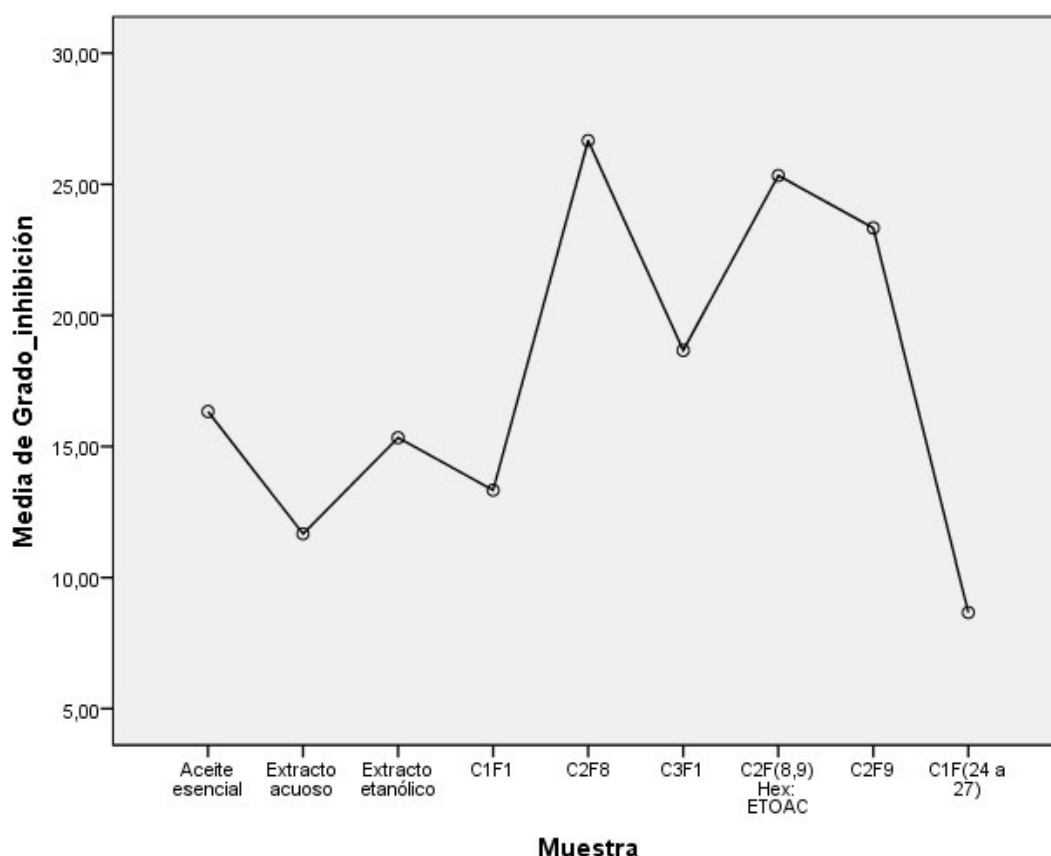


Figura 55: Medias para el grado de inhibición de Escherichia coli. Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

Una vez que se ha determinado que existen diferencias entre las medias, se realizó una prueba post hoc de Tukey para identificar subconjuntos homogéneos de medias que no se diferencian entre sí (Fallas, 2012). Se determinaron 7 subgrupos significativamente iguales, de ellos el de mayor promedio lo tiene el séptimo grupo perteneciente a las muestras C2F (8,9) Hex:ETOAC y C2F8.

La obtención de estos compuestos es producto de la extracción, aislamiento y purificación del extracto de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) en el análisis fitoquímico, mediante procedimientos complejos, demorados y con el uso de reactivos químicos especializados. Por esta razón, no se puede trabajar con estos compuestos, obtenidos en muy escasas cantidades, por lo

que se eligió el aceite esencial en el cuarto subgrupo homogéneo, donde se concibe están presentes mayoritariamente estos compuestos y es también la muestra más accesible y de mayor grado de inhibición contra la bacteria *Escherichia coli*.

1. *Pseudomonas aeruginosa*

Cuadro 43: Datos del grado de inhibición para Pseudomonas aeruginosa

Grado_inhibición	Muestra
12	1
11	1
12	1
11	4
10	4
10	4
11	7
10	7
11	7
10	8
10	8
10	8
11	9
12	9
12	9

Cuadro 44: Anova de una vía para el grado de inhibición de Pseudomonas aeruginosa

Grado_inhibición

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	7,067	4	1,767	6,625	,007
Dentro de grupos	2,667	10	,267		
Total	9,733	14			

Fuente. Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

$$H_0: \mu_1 = \mu_4 = \mu_7 = \mu_8 = \mu_9$$

H_a : al menos una de las medias es diferente

Con una probabilidad del 5% de cometer un error tipo I y con un valor p $(0,000) < \alpha$ $(0,05)$, se rechaza la hipótesis nula, concluyendo que al menos una de las medias de las muestras presenta diferente grado de inhibición para *Pseudomonas aeruginosa*.

Cuadro 45: Subconjuntos homogéneos para el grado de inhibición de *Pseudomonas aeruginosa*

Grado_inhibición			
HSD Tukey ^a			
Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
C2F(8,9) Hex:ETOAC	3	10,0000	
C1F1	3	10,3333	10,3333
C3F1	3	10,6667	10,6667
Aceite esencial	3		11,6667
C2F9	3		11,6667
Sig.		,539	,061

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a.-Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Fuente. Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

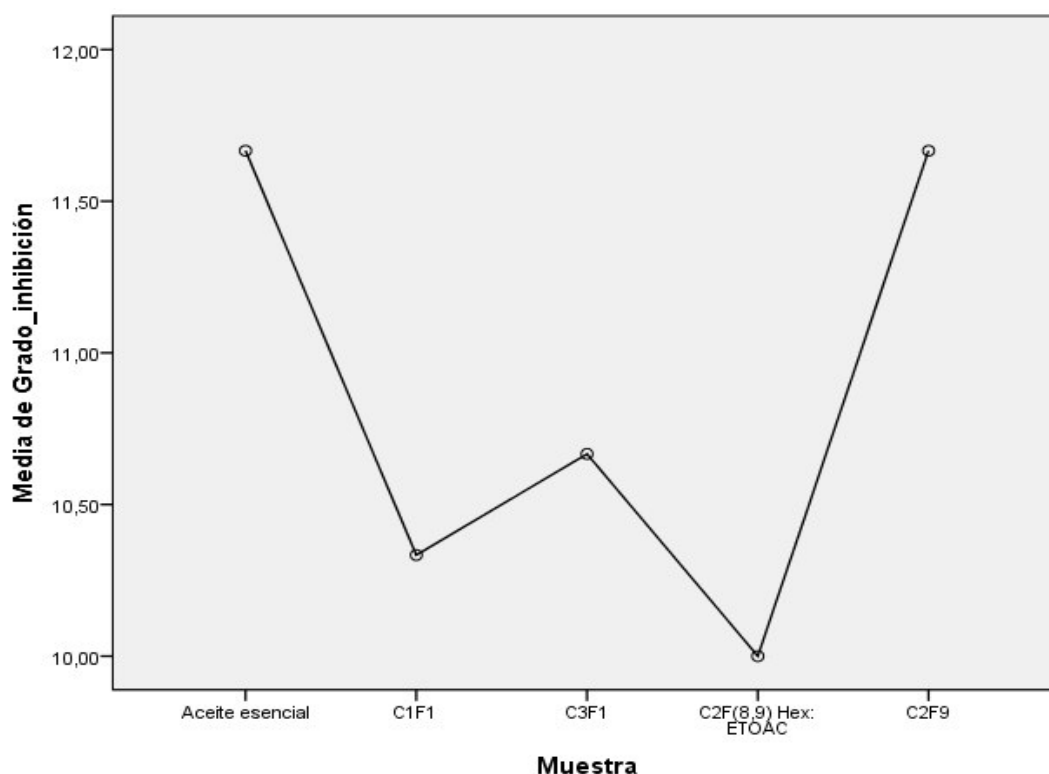


Figura 56: Medias para el grado de inhibición de *Pseudomonas aeruginosa*. Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

Al establecer que existen diferencias entre las medias, se realizó una prueba post hoc de Tukey, para identificar subconjuntos homogéneos de medias que no se diferencian entre sí (Fallas, 2012). Se determinaron 2 subgrupos significativamente iguales, de ellos el de mayor promedio lo tiene el segundo grupo perteneciente a las muestras C1F1, C3F1, Aceite esencial, C2F9.

Se decide usar el aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) porque presenta el mayor promedio de grado de inhibición contra la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2.3. Hipótesis para el cumplimiento del objetivo 3

Se obtuvieron los datos de 3 réplicas de la aplicación de 5 concentraciones del extracto fitoquímico seleccionado (aceite esencial) frente al crecimiento de 4 tipos de cepas de bacterias donde presentó actividad antibacteriana. Posterior se aplicó Anova de una vía con los datos obtenidos.

Esto se realizó con la finalidad de comprobar la hipótesis planteada referente a qué concentración del aceite esencial de las hojas de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum Luteynii* Todzia), contiene los grupos de metabolitos secundarios con el mayor grado de inhibición del crecimiento bacteriano para establecer su utilidad medicinal.

4.2.3.1. Población.

Las unidades experimentales de la población fueron los posibles grupos de 5 kilogramos que se pudieron generar de la totalidad de hojas desarrolladas del piso altitudinal 2 de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum Luteynii* Todzia).

4.2.3.2. Muestra.

La muestra fue tomada de manera no aleatoria, constituyéndose en sus unidades experimentales grupos de 5 kilogramos de hojas desarrolladas y tomadas del piso altitudinal 2 del bosque de Jacarón, para la extracción del aceite esencial.

4.2.3.3. Hipótesis.

¿Cuál es la concentración del aceite esencial de las hojas de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum Luteynii* Todzia), que contiene los grupos de metabolitos secundarios con el mayor grado de inhibición del crecimiento bacteriano, para establecer su utilidad medicinal?

Hipótesis nula: todas las concentraciones del aceite esencial extraídos de las hojas de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) presentan igual grado de inhibición del crecimiento de 4 especies de bacterias.

Hipótesis alternativa: al menos una de las concentraciones del aceite esencial de las hojas de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) difiere significativamente en el nivel de inhibición del crecimiento de cuatro especies de bacterias.

4.2.3.4. Grado de inhibición de muestras de aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) probado con concentraciones diferentes frente a 4 tipos de bacterias.

Del análisis estadístico realizado a los datos obtenidos del análisis microbiológico relacionado con el grado de inhibición frente a 5 tipos de bacterias del aceite esencial, extracto acuoso, extracto etanólico, y los productos del análisis fitoquímico cuantitativo C1F1 Hexano: ETOAC 80:20, C2F3 líquido puro, C2F8, C3 F1 cristales, C2F(8,9), Hex:ETOAC 80:20, C2F9 y C1F(24 a 27), se determinó que los compuestos puros tienen mayor actividad, pero por la dificultad de su obtención se decide usar el aceite esencial extraído directamente del Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) para probar el grado de inhibición frente a las 4 bacterias donde se observó su actividad.

Para este análisis se usaron las siguientes concentraciones:

Cuadro 46: Concentraciones del aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) para el análisis microbiológico

1	100000 ppm
2	50000 ppm
3	25000 ppm
4	12500 ppm
5	6250

1. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) (Gram positiva)

Cuadro 47: Datos del grado de inhibición del aceite esencial para *Staphylococcus aureus*

Halo_inhibición	Concentración
15	1
16	1
15	1
14	2
13	2
14	2
12	3
12	3
11	3

Cuadro 48: Anova de una vía para el grado de inhibición del aceite esencial para *Staphylococcus aureus*

Halo_inhibición

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	20,222	2	10,111	30,333	0,001

Dentro de grupos	2,000	6	0,333		
Total	22,222	8			

Fuente. Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

H_a : al menos una de las medias es diferente

Con una probabilidad del 5% de cometer un error tipo I, con un valor $p(0,001) < \alpha(0,05)$, se rechaza la hipótesis nula, concluyendo que al menos una de las medias de las concentraciones presenta diferente grado de inhibición para la bacteria *Staphylococcus aureus*.

Cuadro 49: Subconjuntos homogéneos para el grado de inhibición del aceite esencial para *Staphylococcus aureus*

Halo_inhibición				
HSD Tukey ^a				
Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
25000 ppm	3	11,6667		
50000 ppm	3		13,6667	
100000 ppm	3			15,3333
Sig		1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos

a.- Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Fuente. Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

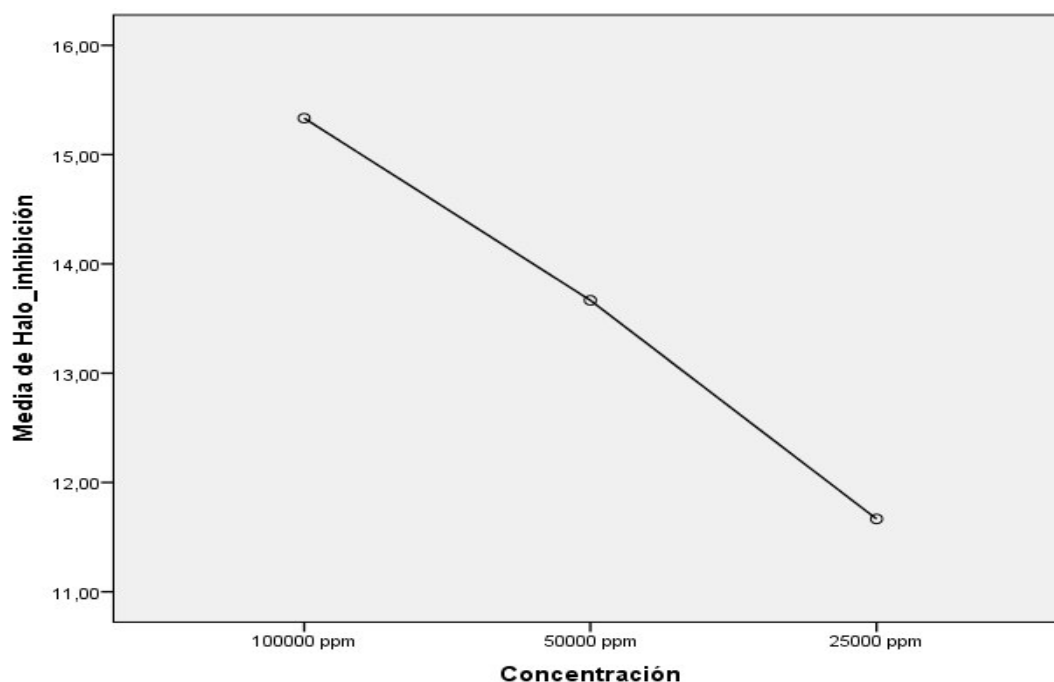


Figura 57: Medias para el grado de inhibición del aceite esencial para *Staphylococcus aureus*. Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

En el scrining microbiológico realizado con 5 concentraciones de aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se registra que solo con 3 concentraciones se observan halos de inhibición para la bacteria *Staphylococcus aureus*.

Al establecer que existen diferencias entre las medias, se realizó una prueba post hoc de Tukey para identificar subconjuntos homogéneos de medias que no se diferencian entre sí (Fallas, 2012). Se determinaron 3 subgrupos significativamente iguales, de ellos el de mayor promedio lo tiene el tercer grupo perteneciente a la concentración 100000 ppm.

2. *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) (Gram negativa)

Cuadro 50: Datos del grado de inhibición del aceite esencial para *Klebsiella pneumoniae*

Halo_inhibición	Concentración
15	1
15	1
16	1
13	2
12	2
13	2
12	3
11	3
12	3
10	4
11	4
10	4

Cuadro 51: Anova de una vía para el grado de inhibición del aceite esencial para *Klebsiella pneumoniae*

Halo_inhibición

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	40,333	3	13,444	40,333	,000
Dentro de grupos	2,667	8	,333		
Total	43,000	11			

Fuente. Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

H_a : al menos una de las medias es diferente

Con una probabilidad del 5% de cometer un error tipo I, con un valor $p(0,000) < \alpha(0,05)$, se rechaza la hipótesis nula, concluyendo que al menos una de las medias de las concentraciones presenta diferente grado de inhibición para la bacteria *Klebsiella pneumoniae*.

Cuadro 52: Subconjuntos homogéneos para el grado de inhibición del aceite esencial para *Klebsiella pneumoniae*

Halo_inhibición				
HSD Tukey ^a				
Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
12500 ppm	3	10,3333		
25000 ppm	3	11,6667	11,6667	
50000 ppm	3		12,6667	
100000 ppm	3			15,3333
Sig.		,085	,225	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a.-Se utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Fuente. Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

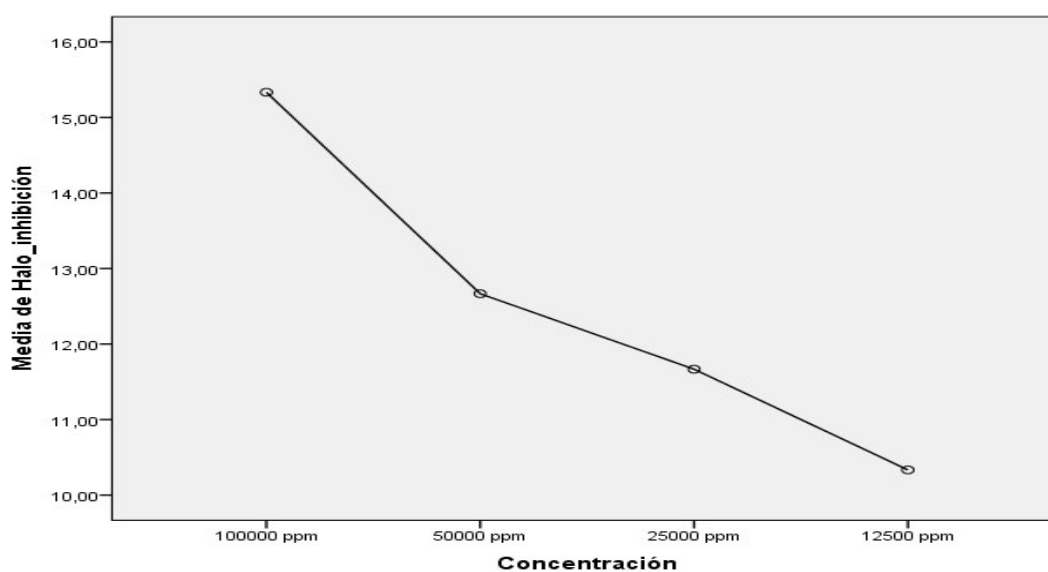


Figura 58: Medias para el grado de inhibición del aceite esencial para *Klebsiella pneumoniae*. Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

En el scrining microbiológico realizado con 5 concentraciones de aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se registra que solo con 4 concentraciones se observan halos de inhibición para la bacteria *Klebsiella pneumoniae*.

Cuando se establece que existen diferencias entre las medias, se realizó una prueba post hoc de Tukey para identificar subconjuntos homogéneos de medias que no difieran entre sí (Fallas, 2012). Al determinar 3 subgrupos significativamente iguales, de ellos el de mayor promedio lo tiene el tercer grupo perteneciente a la concentración 100000 ppm.

3. *Escherichia coli* (ATCC 25922) (Gram negativa)

Cuadro 53: Datos del grado de inhibición del aceite esencial para *Escherichia coli*

Halo_inhibición	Concentración
13	1
12	1
13	1
12	2
12	2
13	2
11	3
12	3
12	3
9	4
10	4
9	4

Cuadro 54: Anova de una vía para el grado de inhibición del aceite esencial para Escherichia coli

Halo_inhibición

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	20,333	3	6,778	20,333	,000
Dentro de grupos	2,667	8	,333		
Total	23,000	11			

Fuente. Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

$$H_o: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

H_a : al menos una de las medias es diferente

Con una probabilidad del 5% de cometer un error tipo I, al contar con un valor p ($0,000$) $< \alpha$ ($0,05$), se rechaza la hipótesis nula, concluyendo que al menos una de las medias de las concentraciones presenta diferente grado de inhibición para la bacteria Escherichia coli

Cuadro 55: Subconjuntos homogéneos para el grado de inhibición del aceite esencial para Escherichia coli

Halo_inhibición

HSD Tukey^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
12500 ppm	3	9,3333	
25000 ppm	3		11,6667
50000 ppm	3		12,3333
100000 ppm	3		12,6667
Sig.		1,000	,225

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Fuente. Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

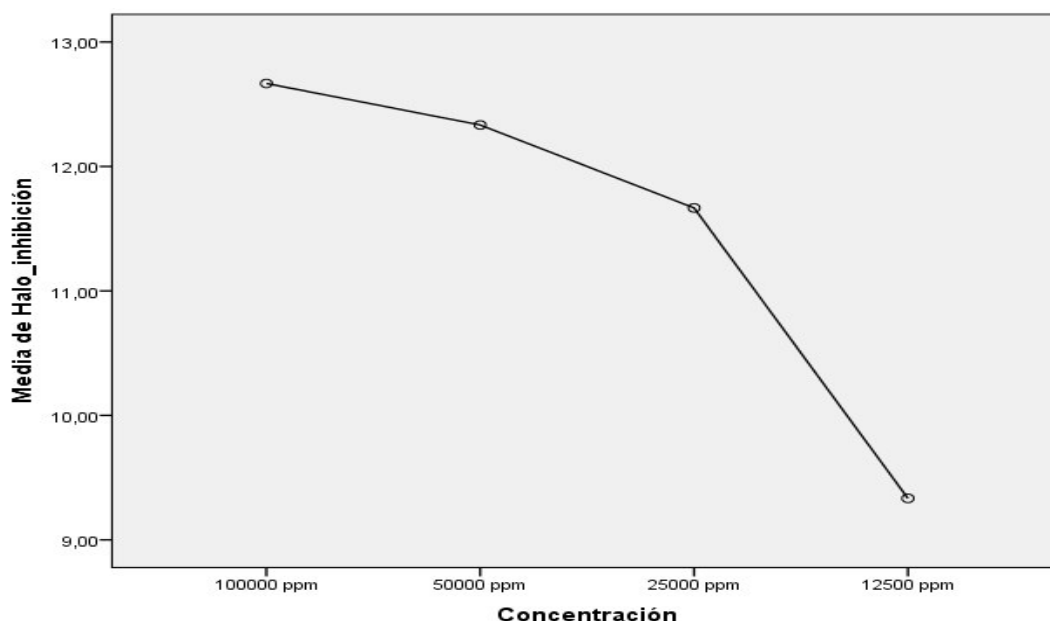


Figura 59: Medias para el grado de inhibición del aceite esencial para *Escherichia coli*. Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

En el scrining microbiológico realizado con 5 concentraciones de aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se registra que solo con 4 concentraciones se observan halos de inhibición para la bacteria *Escherichia coli*.

Al observar que existen diferencias entre las medias, se realizó una prueba post hoc de Tukey para identificar subgrupos similares de medias que no se diferencien entre sí (Fallas, 2012). Se determinaron 2 subgrupos significativamente iguales, de ellos el de mayor promedio lo tiene el segundo grupo formado por las concentraciones de 25000 ppm, 50000 ppm y 100000 ppm.

4. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (Gram negativa)

Cuadro 56: Datos del grado de inhibición del aceite esencial para *Pseudomonas aeruginosa*

Halo_inhibición	Concentración
12	1
11	1
12	1
11	2
10	2
12	2
10	3
11	3
11	3

Cuadro 57: Anova de una vía para el grado de inhibición del aceite esencial para *Pseudomonas aeruginosa*

Halo_inhibición

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,556	2	,778	1,400	,317
Dentro de grupos	3,333	6	,556		
Total	4,889	8			

Fuente. Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

H_a : al menos una de las medias es diferente

Con una probabilidad del 5% de cometer un error tipo I, con un valor p (0,317) > α (0,05), no se rechaza la hipótesis nula, concluyendo que no hay diferencia significativa entre los promedios de los grados de inhibición de las concentraciones usadas en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

En el scrining microbiológico realizado con 5 concentraciones de aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se registra que solo con 3 concentraciones se observan halos de inhibición para la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

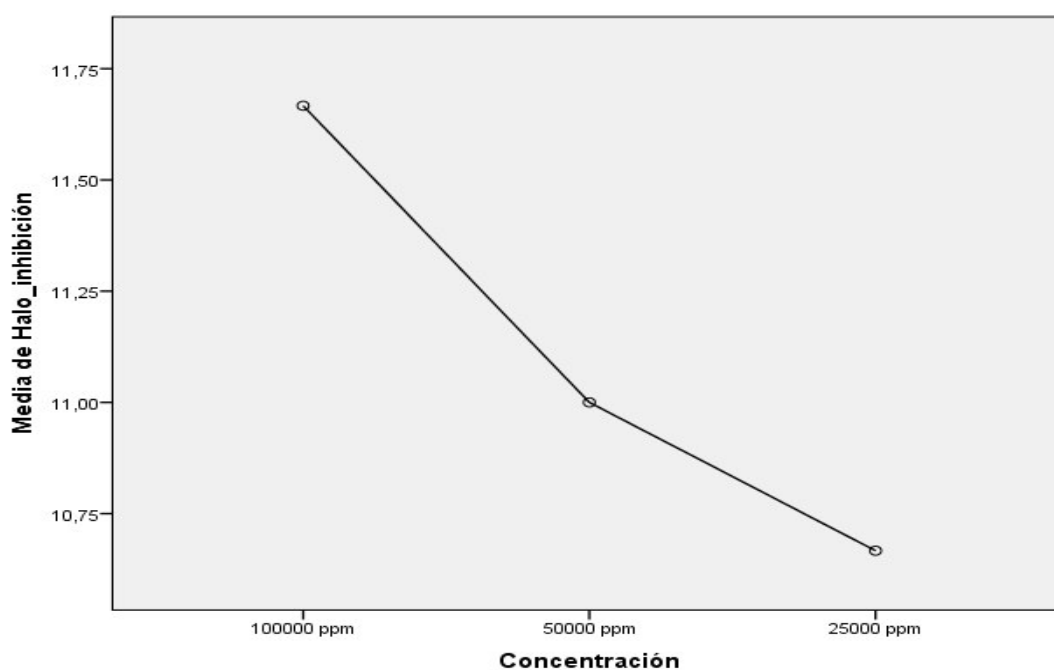


Figura 60: Medias para el grado de inhibición del aceite esencial para *Pseudomonas aeruginosa*. Fuente: Análisis de datos en Minitab por Torres, S., 2019

Cabe mencionar que si se grafican los grados de inhibición frente a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, se puede determinar que lo óptimo sería usar la concentración de 100000 ppm.

CONCLUSIONES

El presente estudio se utilizaron hojas de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), recolectadas en el bosque de Jacarón, del sector de Columbe, Chimborazo, Ecuador, se fundamenta en los conocimientos y costumbres ancestrales de los indígenas que habitan en los espacios aledaños, quienes manejan una noción amplia respecto al uso y a las propiedades medicinales de las especies vegetales presentes en el bosque. Es así que por sus versiones se conoce que han utilizado la infusión de las hojas de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), para prevenir y tratar afecciones respiratorias y gastrointestinales.

Para realizar la determinación de los principios activos de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), se desarrollaron varios procedimientos iniciando por la realización de un nuevo inventario dendrológico de las especies vegetales presentes en el bosque por considerarse una especie no registrada en este sector.

En la caracterización del extracto etéreo se observa la presencia abundante de aceites y grasas a través del ensayo de Sudan; de triterpenos y esteroides, a través del ensayo de Liebermann – Burchard.

En el extracto alcohólico se evidencia la presencia de cantidades moderadas de flavonoides probados a través del ensayo de Shinoda, de fenoles y taninos, determinados por el ensayo de FeCl₃. Estos resultados nos aproximan a su

caracterización con vistas a conocer el rol de la planta y su posible actividad biológica en los seres vivos. Además, se pudo determinar que la especie no posee alcaloides.

En el extracto acuoso, la caracterización cualitativa muestra la presencia moderada de flavonoides mediante el ensayo de Shinoda, saponinas por el ensayo de la espuma, y azúcares reductores a través del ensayo de Fehling.

Se identificaron 28 compuestos químicos que corresponden al 98,62% del total de los compuestos presentes en esta especie, perteneciendo la mayoría a grupos de hidrocarburos monoterpénicos naturales (83,21%). “Los constituyentes más abundantes fueron: α -felandreno (32.72%), α -pineno (13.20%), (Z)- β -ocimeno (10.99%), silvestreno (6.51%), biciclogermacreno (5.05%), 1.8-cineol (4.95%), (E)- β -ocimeno (3.88%) y germacreno D (3.20%)”.

Los aceites del género *Hedyosmum* comparten un buen número de componentes comunes (más del 95%), pero los constituyentes más abundantes presentes en el aceite esencial de Tarqui, difieren de los reportados para otros especímenes del género *Hedyosmum* en el Ecuador, Perú, Colombia, Brasil, Bolivia, Venezuela y Costa Rica.

El aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), contiene como uno de sus constituyentes más abundantes al silvestreno.

El número y variedad de compuestos identificados en el aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), representa un aporte a la fitoquímica de la especie *Hedyosmum luteynii* Todzia, Chloranthaceae en el Ecuador.

Este estudio ha permitido identificar como componentes principales del aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) es el α -felandreno y α -pineno, y estos compuestos han mostrado actividades que se pueden

relacionar con los usos etnomédicos reportados oralmente por los lugareños de la región como broncodilatador y anti-inflamatorio.

El presente trabajo investigativo muestra el gran potencial del aceite esencial del Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) frente a bacterias gram positivas “(*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) y Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC: 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031)”. Los resultados obtenidos se constituyen en un aporte significativo a la investigación fitoquímica del aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), siendo el primer reporte sobre la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de esta especie.

De las 10 muestras probadas, se evidenció actividad microbiológica contra el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, de las muestras 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 9.

Para la bacteria *Enterococcus faecalis* no hay respuesta positiva de ninguna de las 10 muestras.

Para la bacteria *Klebsiella pneumoniae* sólo la muestra 1 presenta actividad.

Para la bacteria *Escherichia coli*, las muestras 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 y 10 presentan actividad de inhibición del crecimiento; como respuesta particular, la muestra 10 es exclusivamente activa para esta bacteria.

En el caso de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* dan respuesta positiva de inhibición del crecimiento las muestras 1, 4, 7, 8 y 9.

Como control positivo se utilizó Amikacina 30 µg para *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y para *Staphylococcus aureus* Erytromicina 15 µg; mientras que como control negativo se utilizó Dimetil Sulfóxido (DMSO).

En el análisis estadístico de los datos se usó ANOVA de una vía considerando a las muestras como el único factor y trabajando con 3 réplicas a un nivel de confianza del 95%. La mejor sensibilidad para inhibición de las cepas bacterianas utilizadas, la mostraron los compuestos puros obtenidos del análisis fitoquímico del extracto de las hojas desarrolladas de Tarqui, especialmente la muestra 6.

Para determinar la mejor concentración del aceite esencial de Tarqui, que inhiba el crecimiento de las cepas de bacterias: (*Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) (Gram positiva), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) (Gram negativa), *Escherichia coli* (ATCC 25922) (Gram negativa), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (Gram negativa)), se realizó un nuevo estudio microbiológico con 5 concentraciones (100000 ppm, 50000 ppm, 25000 ppm, 12500 ppm y 6250 ppm), los datos fueron tratados mediante ANOVA de una vía considerando a las concentraciones como el único factor y trabajando con 3 réplicas a un nivel de confianza del 95%.

Para el *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) (Gram positiva) presentaron inhibición del crecimiento las concentraciones de 100000, 50000 y 25000 ppm.

Para *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) (Gram negativa) son activas las concentraciones de 100000, 50000, 25000 y 12500 ppm.

En el caso de *Escherichia coli* (ATCC 25922) (Gram negativa), presentan actividad las concentraciones de 100000, 50000, 25000 y 12500 ppm.

Para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (Gram negativa) sólo muestran actividad las concentraciones de 100000, 50000 y 25000 ppm.

La concentración de 6250 ppm no fue reactiva para ninguna de las 4 cepas bacterianas.

Se determinó que la mejor actividad antibacteriana para las 4 cepas de bacterias probadas fue la muestra con una concentración de 100000 ppm de aceite esencial de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia).

La dosis mínima inhibitoria (CMI) para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* fue de 25000 ppm, mientras que para *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* de 12500 ppm.

Los resultados obtenidos en el scrining microbiológico nos permiten concluir que los compuestos químicos constituyentes del aceite esencial de las hojas desarrolladas de Tarqui, del bosque natural del ecosistema Jacarón ubicado en la parroquia Juan de Velasco, cantón Colta, provincia de Chimborazo, Ecuador, son los responsables de la actividad antibacteriana observada.

En las pruebas farmacológicas *in vivo* se probó extracto acuoso de Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) suministrado diariamente de manera oral a 12 ratones endogámicos, por un lapso de 15 días, observándose que no existe efecto tóxico visible en el conteo y valores medidos de los bio-indicadores de la biología y química sanguínea de los ratones.

RECOMENDACIONES

Al ser Ecuador, un país en vías de desarrollo, la población recurre con frecuencia a la medicina tradicional, pero hay que tener precaución con el uso indiscriminado y continuo de las plantas a las que se les confiere estas propiedades, pues las personas las utilizan directamente para una u otra enfermedad, sin embargo, el hecho de que sea natural no significa que no pueda ser tóxico, es por ello que hay que identificar y comprobar si las propiedades bio-activas son reales y las dosis en que podrían ser efectivas para tratar alguna dolencia. Por lo que se recomienda continuar con la validación del uso etnomédico pronunciado por los habitantes del sector aledaño al bosque de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia) y de otras especies vegetales presentes en Ecuador y en el callejón andino.

Por los resultados obtenidos en el análisis microbiológico realizado para determinar la actividad de los metabolitos secundarios presentes en la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia), donde se observó que el aceite esencial extraído de las hojas desarrolladas inhibieron el crecimiento de cuatro tipos de cepas bacterianas, se recomienda continuar con los estudios de bioprospección para probar la posible actividad biológica, microbiológica, farmacológica, antifúngica, repelente, biopesticida, e incluso en el área de las fragancias y aromas, por ser una especie vegetal de características aromáticas.

Esta investigación se desarrolló en el marco de un Convenio firmado entre el Ministerio del Ambiente del Ecuador y la Universidad Nacional de Chimborazo,

por lo que se recomienda a sus autoridades mantener este nexo que permita aunar esfuerzos entre las dos instituciones, con miras a la protección y conservación del bosque de Jacarón y sus invaluable y potenciales especies presentes en su territorio.

Las pruebas in vivo fueron realizadas en el bioterio de la Universidad Nacional de Chimborazo, llegando únicamente a probar la inocuidad del extracto acuoso suministrado por un lapso de 15 días a ratones endogámicos (cepa C57BL/6, 20 semanas de edad), adultos, machos, los cuales no mostraron cambios importantes en su bioquímica sanguínea, por lo que se recomienda continuar con los estudios farmacológicos que podrían derivar en la consecución de un posible fitofármaco.

Por tratarse de una investigación etnobotánica, se recomienda socializar los resultados de la misma a los miembros de la Comunidad de Pangor y Columbe con el propósito de crear conciencia de cuidado y protección ambiental del bosque de Jacarón.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acebey, L., Jullian, V., Sereno, D., Chevalley, S., Estevez, Y., Moulis, C., Beck, S., Valentin, A., Gimenez, A. & Sauvain, M. (2010). Anti-Leishmanial Lindenane Sesquiterpenes from *Hedyosmum angustifolium*. *Planta Médica*, 76(4), 365–368. doi: 10.1055/s-0029-1186192
- Adams, R. (2007). *Identification of essential oil components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry, 4th edition*. Illinois, Estados Unidos de América: Allured Publishing Corporation.
- Adersen, A., & Henning, A. (1997). Plants from Réunion Island with alleged antihypertensive and diuretic effects an experimental and ethnobotanical evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*, 58(3), 189-206.
- Aguirre, Z., Cabrera, O., Sanchez, A., Merino, B., & Maza, B. (2003). Composición florística , endemismo y etnobotánica de la vegetación del Sector Oriental , parte baja del Parque Nacional Podocarpus. *Lyonia*, 3(1), 5–13.
- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Nebauer, S., Molina, R., y Gómez-Gómez, L. (2015). Saffron: Its Phytochemistry, Developmental Processes, and Biotechnological Prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(40), 8751–8764. doi: 10.1021/acs.jafc.5b03194
- Alam, F. & Saqib, N. (2015). Pharmacognostic standardization and preliminary phytochemical studies of *Gaultheria trichophylla*. *Pharmaceutical Biology*, 53(12), 1711–1718. doi: 10.3109/13880209.2014.1003355
- Álvarez, L., Gálvez, A., y Salazar, J. (2016). Etnobotánica del Darién Caribe colombiano: los frutos del bosque. *Etnográfica*, 20(1), 193. doi: <https://doi.org/10.4000/etnogra>
- Analysis of bioactivities and chemical composition of *Ziziphus joazeiro* Mart. using HPLC-DAD.
- Ansaloni, R., Wilches, I., León, F., Peñaherrera, E., Orellana, A., Tobar, V. y De Witte, P. (2010). Estudio preliminar sobre plantas medicinales utilizadas en algunas comunidades de las provincias de Azuay, Cañar y Loja, para afecciones del aparato gastrointestinal. *Revista Tecnológica ESPO*, 23(1), 89–97.
- Antonelli, A., & Sanmartín, I. (2011). Mass Extinction, gradual cooling, or rapid radiation? Reconstructing the spatiotemporal evolution of the ancient angiosperm genus *Hedyosmum* (Chloranthaceae) using empirical and simulated approaches. *Systematic Biology*, 60(5), 596–615. doi: <https://doi.org/10.1093/sysbio/syr062>

- Antunes, S. y Quirós, S. (2017). Métodos analíticos aplicados a la identificación de productos de la Real Farmacopea Española. *Universidad Complutense*. Recuperado de <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Poster/SOFIA%20ANTUNES%20MARTINS.pdf>
- Artigas, R., y Díaz, F. (2013). Muestreo en transecto de formaciones vegetales de fanerófitos y caméfitos (I): fundamentos metodológicos. *Estudios Geográficos*, LXXIV(274), 67–88. doi: 10.3989/estgeogr.201303
- Azócar, A. y Rada, F. (2006). Ecofisiología de Plantas de Páramo. *Centro Editorial Litorama*, 182.
- Azuero, A., Jaramillo, C., San Martín, D. y D'Armas, H. (2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en el Ecuador. *Ciencia UNEMI*, 9(20), 11-18. Recuperado de <http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/342/295>
- Ballesteros, P., Claramunt, R., Sanz del Castillo, D. y Teso, E. (2013). *Química orgánica avanzada*. Madrid, España: Universidad Nacional de Educación a Distancia.
- Balslev, H., Navarrete, H., De la Torre, L., Muriel, P. y Macía, M. J. (2008). *Enciclopedia de Plantas Útiles del Ecuador*. Quito, Ecuador: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.
- Barquero, A. (2007). Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. *Química Viva*, 6(2), 19-35.
- Berdonces, J. (1995). Principios activos y preparaciones farmacéuticas de las plantas medicinales. *Natura Medicatrix*, 37–38, 42–48.
- Bermúdez, A., Oliveira, M., & Velázquez, D. (2005). La Investigación Etnobotánica sobre Plantas Medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*, 30(8), 453–459.
- Bernal, H., García, H., Londoño, C., Molano, M., Quevedo, G., & Vásquez, C. (2011). *Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia*. Bogotá, Colombia: Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial 2011.
- Binnewies, M., Glaum, R., Schmidt, M. & Schmidt, P. (2013). Chemical vapor transport reactions - A historical review. *ZAAC Zeitschrift Fur Anorganische Und Allgemeine Chemie*, 639(2), 219–229. doi: <https://doi.org/10.1002/zaac.201300048>
- Blandón, A., Santos, L., Feitosa, A., Goulart, A. y Mosquera, O. (2014). Tamizaje de actividad antibacteriana de extractos de plantas de la ecoregión cafetera colombiana. *Salud & Sociedad*, 1(1), 6–11.
- Brack, A. (1997). Biodiversidad Amazónica y Manejo de Fauna Silvestre. *Manejo de Fauna Silvestre en la Amazonía*, 3–6.
- Brito, S., Coutinho, H., Talvani, A., Coronel, C., Barbosa, A., Vega, C.,

- Figueredo, F., Tintino, S., Lima, L., Boligon, A., Athayde, M. y Menezes, I., (2015). Analysis of bioactivities and chemical composition of *Ziziphus joazeiro* Mart. using HPLC-DAD. *Food Chemistry*, 1(186), 185–191. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.031
- Brito SM1, Coutinho HD2, Talvani A3, Coronel C4, Barbosa AG1, Vega C4, Figueredo FG5, Tintino SR5, Lima LF5, Boligon AA6, Athayde ML6, Menezes IR
- Burbano, D. (2017). *Técnicas efectivas de conservación ex situ del germoplasma forestal nativo representativo del bosque de Jacarón* (Tesis doctoral). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú
- Burbano, A., Apugllón, S., y Burbano, D. (2014). Inventario dendrológico del ecosistema de bosque Jacarón, cantón Colta, provincia de Chimborazo, Ecuador. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*, 17(34), 35–40.
- Caballero, J., Casas, A., Cortés, L., y Mapes, C. (1998). Patrones en el conocimiento , uso y manejo de plantas en pueblos indígenas de México. *Estudios Atacameños*, 16(16), 181–195. doi: <https://doi.org/10.22199/S07181043.1998.0016.00005>
- Caniago, I., & Stephen, F. S. (1998). Medicinal plant ecology, knowledge and conservation in Kalimantan, Indonesia. *Economic Botany*, 52(3), 229–250. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02862141>
- Cañigueral, S., Dellacassa, E., y Bandoni, A. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo?. *Latin American Journal of Pharmacy*, 22(3), 265-278. Recuperado de http://www.latamjpharm.org/trabajos/22/3/LAJOP_22_3_6_1_S966JS548J.pdf
- Caranqui, J. (2017). Árboles y arbustos nativos potenciales para reforestación en la Sierra Central, Ecuador. *Enfoque UTE*, 8 (5), 103–109. doi: <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1965.9601>
- Caranqui, J. y Pino, M. (2016). Informe sobre el estado de los remanentes de bosques en la cuenca hidrográfica “Coco-Panza”. *DSPACE Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Artículos Forestal*, 1-9. Recuperado de http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7946/1/Informe_Coco_Panza.pdf
- Cardenas, L., Rodríguez, J., Villaverde, C., Riguera, R., Cadena, R., & Otero, J. (1992). The Analgesic Activity of *Hedyosmum bonpiandianum*: Flavonoid Glycosides. *Planta Medica*, 59, 26–27.
- Carlquist, S. (1992). Wood anatomy of *Hedyosmum* (Chloranthaceae) and the tracheid-vessel element transition. *Aliso*, 13(3), 447–462. doi: 10.5642/aliso.19921303.04
- Carreño, P. (2016). *La etnobotánica y su importancia como herramienta para la articulación entre conocimientos ancestrales y científicos: Análisis de los estudios sobre las plantas medicinales usadas por las diferentes*

- comunidades del Valle de Sibundoy, Alto Putumayo* (Tesis de pregrado). Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Facultad de Ciencias y Educación, Bogotá, Colombia.
- Carvajal, C. y Quintero, M. (2012). *Caracterización fitoquímica, actividad antimicrobiana y antimicótica del aceite esencial de congona (Peperomia inaequalifolia Ruiz&Pav.) Piperaceae* (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Cascante, A. y Estrada, A. (2001). Composición florística y estructura de un bosque húmedo premontano en el Valle Central de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 49(1), 213–225.
- Cervantes, E., García, R. y Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Patología Clínica*, 61(1), 28–40.
- Chandrasekharan, C., Frisk, T. y Campos, J. (1996). *Desarrollo de productos forestales no madereros en América latina y El Caribe*. Santiago de Chile, Chile: Serie Forestal. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-t2360s.pdf>
- Chaparro, J., Badri, D. & Vivanco, J. (2014). Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME Journal*, 8(4), 790–803. doi: 10.1038/ismej.2013.196
- CLSI. (2018). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Pensilvania, Estados Unidos de América: Clinical and Laboratory Standards Institute
- CORANTIOQUIA Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia. (2006). *Diversidad Vegetal en Donmatías*. Recuperado de http://www.corantioquia.gov.co/ciadoc/FLOA/AIRNR_CN_6425_2005_Tomo1.pdf
- Cordero, D., Moreno, A. y Kosmus, M. (2008). *Manual para el desarrollo de mecanismos de pago/compensación por servicios ambientales*. Quito, Ecuador: GTZ, Inwent y Global Bussiness. Recuperado de http://www.oea.org/DSD/PES/course2/documentos/Manual_PSA_GTZ.pdf
- Cornejo, M., Cantón, M. y Llera, R. (2008). *Teorías y prácticas emergentes en antropología de la religión*. Zaragoza, España: Donostia, Ankulegi Antropologia Elkartea, 2008
- Cotton, C. (1998). *Ethnobotany: Principles and Applications*. Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons.
- Cuello, M., Jaramillo, G., Canchingre, E., Pérez, J., Castro, C. y Cabrera, O. (2017). Determinación de componentes nutricionales presentes en las hojas secas de *Annona muricata* L. (Guanábana). *Cumbres*, 3(1), 9–16.
- Cunningham, A. A. (1996). Disease Risks of Wildlife Translocations. *Conservation Biology*. 10(2), 349–353. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1996.10020349.x>
- Danis, M. y Rojas, L. (2012). Composición química del aceite esencial de *Hedyosmum glabratum*. *Ciencia*, 20, 68–72.

- Davies, N. (1990). Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography A*, 503(1990), 1-24. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)81487-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)81487-4)
- Davis, M. A., Wrage, K. J., & Reich, P. B. (1998). Competition between tree seedlings and herbaceous vegetation: support for a theory of resource supply and demand. *Journal of Ecology*, 86(4), 652–661.
- De Feo, V. & Urrunaga, R. (2013). Composition of the Essential Oil of *Hedyosmum scabrum* (R. et P.) Solms (Chloranthaceae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 10(1), 41-45. doi: DOI: 10.1080/0972060X.2007.10643517
- De La Torre, L., Muriel, P. y Balslev, H. (2006). *Etnobotánica en los Andes del Ecuador. Botánica Económica de Los Andes Centrales*, 2006, 246-267.
- Delgado, P. A., Quijano, C. E., Morales, G., & Pino, J. A. (2010). Composition of the Essential Oil From Leaves and Fruits of *Hedyosmum colombianum* Cuatrec. Grown in Colombia. *Journal of Essential Oil Research*, 22(January 2013), 234–236
- ECOBONA, Programa Regional para la Gestión Social de Ecosistemas Forestales Andinos. (2010). *Sector Forestal Ecuatoriano: propuestas para una gestión forestal sostenible*. Recuperado de <http://www.asocam.org/sites/default/files/publicaciones/files/b80b90faa6ba676f2a621f72f8c7a188.pdf>
- Escobedo-Moratilla, A., Barba de la Rosa, A. y Pérez-Urizar, J. Modelos preclínicos in vitro e in vivo para la evaluación de la actividad biológica en estudios de biocomparabilidad
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2004). Inventario Forestal Nacional. Manual de Campo. *Programa de Evaluación de los Recursos Forestales*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-ae578s.pdf>
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2009). Guía para la descripción de suelos. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-a0541s.pdf>
- Fallas, J. (2012). *ANÁLISIS DE VARIANZA: Comparando tres o más medias*. Recuperado de http://www.ucipfg.com/Repositorio/MGAP/MGAP-05/BLOQUE-ACADEMICO/Unidad-2/complementarias/analisis_de_varianza_2012.pdf
- Frei, B., Heinrich, M., Herrmann, D., Orjala, J., Schmitt, J., & Sticher, O. (1998). Phytochemical and Biological Investigation of *Begonia heracleifolia*. *Planta Medica*, 64(4), 385–386. doi: 10.1055/s-2006-957460
- Fun, C. & Svendsen, B. (1990). The essential oil of *Hyptis suaveolens* Poit. Grown on Aruba. *Flavour And Fragrance Journal*, 5(3), 161–163. doi: 10.1002/ffj.2730050306
- Gallucci, S., Placeres, A., Porto, C., Barbizan, D., Costa, I., Marques, K.,

- Benevides, P. & Figueiredo, R. (2010). Essential Oil of *Eugenia uniflora* L.: an Industrial Perfumery Approach. *Journal of Essential Oil Research*, 22(2), 176–179. doi: 10.1080/10412905.2010.9700296
- Giraldo, D. (2001). Análisis florístico y fitogeográfico de un bosque secundario pluvial andino, Cordillera Central (Antioquia, Colombia). *Darwiniana*, 39(3-4), 187–199.
- Gómez, M. y Tito, V. (2017). *Análisis multivariado de componentes terpénicos, en aceite esencial de Hierba Luisa (Cymbopogon citratus), mediante espectrofotometría UV - visible derivada* (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- González, R., Zamora, Z., Luque, Y., Frank, H. y Menéndez, S. (2007). Efecto del OLEOZON® frente a lesiones gástricas inducidas por indometacina en ratas. *REDVET*, VIII(3), 1–6.
- Granica, S., Kluge, H., Horn, G., Matkowski, A., & Kiss, A. (2015). The phytochemical investigation of *Agrimonia eupatoria* L. and *Agrimonia procera* Wallr. as valid sources of *Agrimoniae herba* - The pharmacopoeial plant material. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 114, 272–279. doi: 10.1016/j.jpba.2015.05.027
- Gregorí, B., Guerra, M., Mieres, G., Alba, L., Brown, A., Rangel-Vázquez, N., Sosa, M. y De la Hoz, Y. (2008). Caracterización estructural de poliuretanos mediante espectroscopía FTIR y RMN (^1H y C^{13}). *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 9(4), 377–388. Recuperado de <http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/JUL08/gregori.pdf>
- Guerrini, A., Sacchetti, G., Grandini, A., Spagnoletti, A., Asanza, M., & Scalvenzi, L. (2016). Cytotoxic Effect and TLC Bioautography-Guided Approach to Detect Health Properties of Amazonian *Hedyosmum sprucei* Essential Oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 8 pages. Article ID 1638342. doi: <https://doi.org/10.1155/2016/1638342>
- Gutiérrez, H. & De la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. México, D.F., México: MCGRAW-HILL/Interamericana Editores, S.A. de C.V.
- Hall, P., & Bawa, K. (1993). Methods to assess the impact of extraction of non-timber tropical forest products on plant populations. *Economic Botany*, 47(3), 234–247.
- Hernández, J. (2011). *Caracterización fitoquímica, actividad antibacteriana y antioxidante de extractos de plantas medicinales utilizadas en Pereira y Santa Rosa de Cabal (Risaralda)* (Tesis de pregrado). Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnologías, Tecnología Química, Pereira, Colombia.
- Herrera, M. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: Metodología de laboratorio. *SCIELO*, 34. Recuperado de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010

- Herrera, C., Morocho, V., Vidari, G., Bicchi, C., & Gilardoni, G. (2018). Phytochemical Investigation of Male and Female *Hedyosmum scabrum* (Ruiz & Pav.) Solms Leaves from Ecuador. *Chemistry & Biodiversity*, 15(2). doi: 10.1002/cbdv.201700423
- Hoppe, J. (2001). *Morphologie des Blattes*. Alemania: Institut für Systematische Botanik und Ökologie, Universität Ulm
- Hórak, M. (Ed.). (2015). *Etnobotánica y Fitoterapia en América*. Brno, República Checa: Universidad de Mendel en Brno, Facultad de Desarrollo Regional y Estudios Internacionales.
- Iwalokun, B., Iwalokun, S., Hodonu, S., Aina, O. & Agomo, P. (2012). Evaluation of microalbuminuria in relation to asymptomatic bacteruria in Nigerian patients with sickle cell anemia. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 23(6), 1320–1330. doi: 10.4103/1319-2442.103589.
- Jadán, O., Toledo, C., Tepán, B., Cedillo, H., Peralta, Á., Zea, P., Castro, P., y Vaca, C. (2017). Comunidades forestales en bosques secundarios alto-andinos (Azuay, Ecuador). *Bosque (Valdivia)*, 38(1), 141–154. doi: <https://doi.org/10.4067/S0717-92002017000100015>
- Jimenez, L. (2008). *Incremento del valor nutritivo de la pasta base para la elaboración de pizza, mediante la incorporación de chocho* (Tesis de pregrado). Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito, Ecuador.
- Jørgensen, P. & León-Yáñez, S. (Eds.). (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 75(i–viii), 1–1182
- Kirchner, K., Wisniewski, A., Cruz, A., Biavatti, M., & Netz, D. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(5), 692–699. doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000005>
- Kumari, S., Pundhir, S., Priya, P., Jeena, G., Punetha, A., Chawla, K., Jafaree, F., Mondal, S. & Yadav, G. (2014). EssOilDB: a database of essential oils reflecting terpene composition and variability in the plant kingdom. *Database The Journal of Biological Databases and Curation*, 2014. doi: 10.1093/database/bau120
- Lasso, C. A., Señaris, J. C., Alonso, L. E. y Flores, A. (2006). *Evaluación Rápida de la Biodiversidad de los Ecosistemas Acuáticos en la Confluencia de los ríos Orinoco y Ventuari, Estado Amazonas (Venezuela)*. Washington, DC, USA: Boletín RAP de Evaluación Biológica, 30. doi: 10.1896/ci.cabs.2006.rap30
- Liu, S., Wang, S., Song, S., Zou, Y., Wang, J. & Sun, B. (2017). Characteristic differences in essential oil composition of six *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. (Rutaceae) cultivars and their biological significance. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 18(10), 917–920. doi: 10.1631/jzus.B1700232
- Lorenzo, D., Loayza, I., & Dellacassa, E. (2003). Composition of the essential

- oils from leaves of two *Hedyosmum* spp. from Bolivia. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(1), 32–35. doi: <https://doi.org/10.1002/ffj.1146>
- Lock de Ugaz, Olga. (2016). *Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales*. Lima, Perú: Departamento académico de Ciencias de la Pontificia Universidad Católica de Perú.
- Luteyn, J. (2000). Páramos: A check list of plant diversity, geographical distribution and botanical literature (Memoirs of the New York Botanical Garden Volume 84). *Kew Bulletin*, 55(84), 1017. doi: 10.2307/4113659
- Mena, P., Medina, G. y Hofstede, R. (Eds.). (2001). Los Páramos del Ecuador. Particularidades, Problemas y Perspectivas. Quito, Ecuador: Abya Yala/Proyecto *Páramo*.
- Mena, L., Tamargo, B., Salas, E., Plaza, L., Blanco, Y., Otero, A. y Sierra, G. (2015). Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(1), 106–116.
- Mera, L. (2015). *Comparación de los métodos Kjeldahl y Dumas para análisis de proteína cruda en materias primas y productos terminados en una planta de alimentos balanceados* (Tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Minitab. (2017). *Métodos y fórmulas para Prueba de varianzas iguales*. Estados Unidos de América: Minitab Inc. International Sales and Support. Recuperado de <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/how-to/test-for-equal-variances/methods-and-formulas/methods-and-formulas/>
- Minitab. (2017). *Prueba de normalidad*. Estados Unidos de América: Minitab Inc. International Sales and Support. Recuperado de <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/statistics/basic-statistics/supporting-topics/normality/test-for-normality/>
- Miño, G. (2007). *Investigación fitoquímica e identificación de principios activos en seis especies del género Baccharis* (Tesis de pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas, Quito, Ecuador.
- Montgomery, D. (2013). *Design and Analysis of Experiments*. Arizona, Estados Unidos de América: John Wiley & Sons, Inc.
- Mora, E. (2000). Algunas consideraciones sobre muestreo. *Revista Geográfica Venezolana*, 41(1), 31–46.
- Moraes, M., Øllgaard, B., Kvist, L., Borchsenius, F. & Balslev, H. (Eds.). (2006). *Botánica Económica de los Andes Centrales*. La Paz, Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés
- Morocho, S. (2015). *Valutazione ecologica, studio fitochimico ed analisi dell'olio essenziale di Hedyosmum scabrum (Ruiz & Pav.) Solms (Chloranthaceae), dalla Provincia di Loja e Zamora - Ecuador*. (Tesis doctoral). Università Degli Studi Di Pavia, Italia.
- Mundina, M., Vila, R., Tomi, F., Ciccio, J., Ibañez, C., Adzet, T., Cañigueral, S.

- (1999). Composition of the essential oils from leaves and fruits of three *Hedyosmum* species from Costa Rica. *Flavour and Fragrance Journal*, 15(3), 201–205.
- Murakami, C., Cordeiro, I., Scotti, M., Moreno, P., & Young, M. (2017). Chemical Composition, Antifungal and Antioxidant Activities of *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) Essential Oils. *Medicines*, 4(3), 55. doi: 10.3390/medicines4030055
- Nantitanon, W., Chowwanapoonpohn, S. & Okonogi, S. (2007). Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Hyptis suaveolens* Essential Oil. *Scientia Pharmaceutica*, 75(1), 35-54. doi: <https://doi.org/10.3797/scipharm.2007.75.35>
- Napoli, E., Siracusa, L., Saija, A., Speciale, A., Trombetta, D., Tuttolomondo, T., La Bella, S., Licata, M., Virga, G., Leone, R., Leto, C., Rubino, L. y Ruberto, G. (2015). Wild Sicilian Rosemary: phytochemical and morphological screening and antioxidant activity evaluation of extracts and essential oils. *Chemistry and Biodiversity*, 12(7), 1075–1094. doi: 10.1002/cbdv.201400274.
- Nitsche, R., Bölsterli, H. & Lichtensteiger, M. (1961). Crystal growth by chemical transport reactions-I: Binary, ternary, and mixed-crystal chalcogenides. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 21(3-4), 199–205. doi: [https://doi.org/10.1016/0022-3697\(61\)90098-1](https://doi.org/10.1016/0022-3697(61)90098-1)
- Orozco, L. y Brumér, C. (Eds.). (2002). *Inventarios forestales para bosques latifoliados en América Central*. Turrialba, Costa Rica: CATIE, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
- Ortíz, M., y Martínez, A. (2018). Caracterización anatómica foliar de cuatro especies cubanas del género *Tolumnia* (Orchidaceae). *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 39, 91–96.
- Pacheco, E. (2012). *Determinación del contenido de ácido ascórbico y la presencia de terpenos en un grupo de briófitas, propias de la zona amazónica norte del Ecuador, expuestas a la acción de una dosis de glifosato* (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- Palá Paúl, J. (2002). *Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género "Eryngium" L, en la Península Ibérica* (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Panda, H. (2008). *Handbook on Oleoresin and Pine Chemicals (Rosin, Terpene Derivatives, Tall Oil, Resin & Dimer Acids)*. New Delhi, India: Discovery Publishing House.
- Pérez, D., y Matiz, L. (2017). Uso de las plantas por comunidades campesinas en la ruralidad de Bogotá D. C., Colombia. *Caldasia*, 39(1), 68–78.
- Phillips, O., Gentry, A., Reynel, C., Wilkin, P., & Gálvez, B. (1994). Quantitative Ethnobotany and Amazonian Conservation. *Conservation Biology*, 8(1), 225-248. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1994.08010225.x>

- Pomilio, B. (2012). Investigación en Química de Productos Naturales en Argentina: Vinculación con la Bioquímica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 46(1), 73–82. Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572012000100011
- Prance, G. T. (1991). What is ethnobotany today. *Journal of Ethnopharmacology*, 32(1-3), 209–216. doi: 10.1016/0378-8741(91)90120-3
- Quispillo, J. (2013). *Separación, purificación y posible identificación de metabolitos secundarios del Escobillón Rojo (Callistemon speciosus)* (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Ríos, M., Borgtoft, H., Granda, G. y Koziol, M. (2007). *Plantas útiles del Ecuador: Aplicaciones, retos y perspectivas*. Quito, Ecuador: Ediciones Abya-Yala.
- Rodríguez, V., Carrión, D., Santillán, P., Recalde, C., & Cargua, F. (2017). Forest biodiversity in Andean brow and its relation to the carbon content in the above-ground biomass. *Acta Agronómica*, 66(1), 35-41. doi: <https://doi.org/10.15446/acag.v66n1.52744>
- Saavedra, M. (2016). *Extracción y caracterización del aceite esencial de las semillas de Tamarindo (Tamarindus indica), Lambayeque - 2014* (Tesis de pregrado). Universidad Señor de Sipán, Pimentel, Perú.
- Salazar, Y. (2012). *Formulación del protocolo de manejo de colección de especímenes del herbario Universitario "Motilon Monaca" de la Universidad Francisco de Paula Santander Ocaña* (Tesis de pregrado). Universidad Francisco de Paula Santander Ocaña, Ocaña, Colombia
- Sales, E., Nebauer, S. G., Mus, M., & Segura, J. (2001). Population genetic study in the Balearic endemic plant species *Digitalis minor* (Scrophulariaceae) using RAPD markers. *American Journal of Botany*, 88(1–12), 1750–1759. doi: <https://doi.org/10.2307/3558349>
- Singh, S. N., Vats, P., Suri, S., Shyam, R., Kumria, M. M. L., Ranganathan, S., & Sridharan, K. (2001). *Effect of an antidiabetic extract of Catharanthus roseus on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats*, 76(3), 269–277.
- Suárez, D. (2008). Formación de un corredor de hábitat de un bosque montano alto en un mosaico de Páramo en el norte del Ecuador. *Ecología Aplicada*, 7(1,2), 9–15.
- Sylvestre, M., Pichette, A., Longtin, A., De Ker, M., Bercion, S. & Legault, J. (2007). Chemical composition of leaf essential oil of *Hedyosmum arborescens* and evaluation of its anticancer activity. *Natural Product Communications*, 2(12). 1269-1272.
- Taiwo, O., Ekundayo, O. & Adeniyi, B. (1999). Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. *Fitoterapia*, 70(4), 440–442. doi: [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00067-2](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00067-2)

- Todzia, C. (1988). Flora Neotrópica. In *Brittonia*, 48. doi: <https://doi.org/10.2307/2805360>
- Todzia, C. A. (1988). Four New Species of *Hedyosmum* (Chloranthaceae) from South America. *Systematic Botany*, 13(1), 21–31. doi: 10.2307/2419238
- Torres, S., Barbarú, A. y Lema, M. (2016). Análisis fitoquímico de un extracto de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum Scabrum*), perteneciente al bosque de Jacarón, Juan de Velasco, Chimborazo, Ecuador. *Mikarimin. Revista Científica Multidisciplinaria*, 2(3), 75–84.
- Torres, S., Tovar, M., García, V., Lucena, M. y Araujo, L. (2018). Composición química del aceite esencial de las hojas de *Hedyosmum luteynii* Todzia (Chloranthaceae). *Revista Peruana de Biología*, 25(2), 173–178. doi: <https://doi.org/10.15381/rpb.v25i2.14289>
- Ulloa Ulloa, C. y Jørgensen, P. (1993). *Arboles y arbustos de los Andes del Ecuador*. Quito, Ecuador: Abya-Yala Ediciones.
- Ulloa Ulloa, C., Acevedo, P., Beck, S., Belgrano, M., Bernal, R., Berry, P., Brako, L., Celis, M., Davidse, G., Forzza, R., Gradstein, S., Hokche, O., León, B., León, Y., Magill, R., Neill, D., Nee, M., Raven, P., Stimmel, H. & Jørgensen, P. (2017). An integrated assessment of the vascular plant species of the Americas. *Science*, 358(6370), 1614-1617. doi: 10.1126/science.aao0398.
- United Nations Industrial Development Organization. (2006). *Medicinal plants originating in the andean high plateau and central region of Bolivia, Ecuador and Peru*. Recuperado de http://repositorio.promperu.gob.pe/repositorio/bitstream/handle/123456789/1455/Medicinal_plantas_originating_andean_high_plateau_central_valleys_Bolivia_Ecuador_Peru_2006_keyword_principal.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. (2017). *Laboratorio De Química Orgánica 502502, Guía No 7: Reconocimiento y Diferenciación de Carbohidratos*. Recuperado de http://avalon.utadeo.edu.co/comunidades/estudiantes/ciencias_basicas/organica/guia_7_carbohidratos.pdf
- Universidad de Guayaquil. (2017). *Identificación de 1 espécimen y descripción. Registro GUAY de identificación: 56*.
- Vidaurre, P. J. (2006). Plantas medicinales en los Andes de Bolivia. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 2006, 268–284.
- Yepes, A. P., Jaramillo, S. L., Valle, J. I., y Orrego, S. A. (2007). Diversidad y composición florística en bosques sucesionales andinos de la región del Río Porce, Colombia. *Actualidades Biológicas*, 29(86), 107–117.
- Zambrano, L., Buenaño, M., Mancera, N., y Jiménez, E. (2015). Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos, Quevedo, Ecuador. *Universidad y Salud*, 17(1), 97–111.

- Zamora-Burbano, A. M. y Arturo-Perdomo, D. E. (2016). Composición química del aceite esencial de hojas *Hedyosmum translucidum* Cuatrec, Chloranthaceae (Granizo). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 15(3), 192–198.
- Zaruma, J. (2015). *Aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios a partir de hojas de plantas con flores femeninas de Hedyosmun strigosum en el cantón Saraguro provincia de Loja* (Tesis de pregrado). Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.
- Zaruma, M., e Illescas, J. (2014). *Determinacion del efecto antibacteriano de aceites esenciales obtenidos de la familia Myracaceae y Lamiceae* (Tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.
- Zent, E., Zent, S., y Marius, L. (2003). Autodemarcando la Tierra: Explorando ideas, árboles y caminos Hoti. *Boletín Antropológico*, 21(59), 313-338. Recuperado de <https://www.flacsoandes.edu.ec/agora/autodemarcando-la-tierra-explorando-ideas-arboles-y-caminos-hoti>

ANEXOS

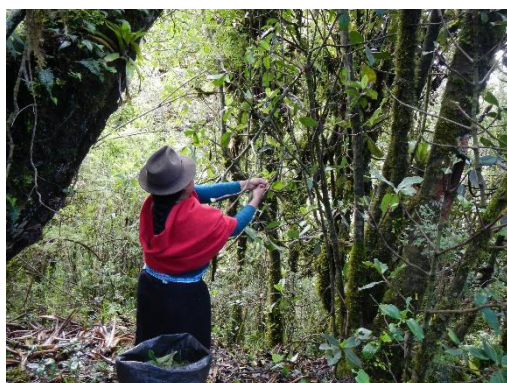
ANEXO 1: Inventario forestal y recolección del material vegetal



1. Inventario forestal



2. *Tarqui* (*Hedyosmum luteynii* Todzia)



3. Recolección de material vegetal



4. Selección de muestras en laboratorio

ANEXO 2: Preparación de muestras en laboratorio



5. Secado de las muestras en la estufa



6. Secado de las muestras en la estufa



7. Triturado de las muestras



8. Triturado de las muestras

ANEXO 3. Extracción del aceite



1. Separación de las partes aéreas de la planta.
2. Hidrodestilación con trampa de clevenger.



ANEXO 4. Identificación y descripción del Tarqui (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

Herbario GUAY
Facultad de Ciencias Naturales
Universidad de Guayaquil

De: MSc. Xavier Cornejo, curador asociado

Para: Dra. Carmen Bonifaz, Decana Fact. CCNN y Directora Herbario GUAY Fecha: jueves, 21 de diciembre de 2017

Asunto: Identificación de 1 espécimen y descripción. Registro GUAY de identificación: 56

Saludos cordiales. Por medio de la presente se entrega la identificación y descripción de 1 espécimen de planta vascular proveniente de Colta-Juan de Velasco, a 3280 msnm, en la provincia de Chimborazo, enviada por la Dra. Silvia Torres Rodríguez, Sub Decana de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Chimborazo (UNACH), para un trabajo de investigación titulado: "Determinación de los principios activos de valor real y/o potencial de la especie forestal nativa Tarqui (*Hedyosmum* sp.); bosque de Jacarón, Juan de Velasco, Chimborazo, Ecuador".

Atentamente,



MSc. Xavier Cornejo Curador
Herbario GUAY

Adj.:
Identificación
cc. Herbario
GUAY

Av. Juan Tanga Marengo y Av. Gómez Linces n.

P.O. Box 09-01-10634

Guayaquil-Ecuador

Herbario GUAY

Facultad de Ciencias Naturales

Universidad de Guayaquil

Clase: Equisetopsida C.

Agardh Subclase: Magnoliidae

Novák ex. Takht.

Superorden: Austrobaileyanae Doweld ex M.W.

Chase & Reveal Orden: Chloranthales R.Br.

Familia: Chloranthaceae R.Br.

ex Sims Género:

Hedyosmum Sw.

Nombre científico: *Hedyosmum luteynii*

Todzia Nombre vernáculo: Tarqui

Descripción taxonómica:

Árbol; ramas con vainas presentes, ca. 2 cm de largo. Hojas simples, opuestas, cartáceas, elípticas hasta obovadas, 8-10 x 3-5 cm, base cuneada hasta obtusa, margen dentado, ápice ligeramente acuminado. Inflorescencias en cimas terminales, con 7-15 flores. Infructescencias púrpura.

